Chemische Untersuchung zum Problem der thermischen Kontraktion des Sehnenkollagens in Abhängigkeit vom Alter

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

ALFRED F. MEYER

Basel

1962

Juris-Verlag Zürich

1963

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546021_0030

Chemische Untersuchung zum Problem der thermischen Kontraktion des Sehnenkollagens in Abhängigkeit vom Alter

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

ALFRED F. MEYER

Basel

Juris-Verlag Zürich

1963

Genehmigt von der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel

auf Antrag

der Herren Professoren M. Brenner und C. Grob

Basel, den 26. Juni 1962. Prof. Dr. M. Eichler (Dekan)

Den Herren Professoren Max Brenner und F. Verzár sei auch an dieser Stelle für das Interesse und die verständnisvolle Unterstützung, die sie meiner Arbeit angedeihen liessen, recht herzlich gedankt.

Alfred Meyer

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 7
1. Zur Definition des Begriffes "Kollagen" 7
2. Bestehende Ansichten über den Aufbau des Kollagens 8
3. Lösliche und umgefällte Kollagenderivate 10
4. Die thermische Kontraktion 13

II. Die thermische Kontraktion 14
1. Das Phänomen der thermischen Kontraktion 14
2. Unsere Problemstellung und Versuchsanordnung 15

III. Vorläufige Kennzeichnung der Spaltstücke 18
a) K-Gelatine 18
b) K-Dialysat 18
c) Elastoid 18

IV. Einfluss des Versuchstieralters auf die thermische Kontraktion 21
1. Vorbemerkung 21
2. Mengenunterschiede 22

V. Altersbedingte Unterschiede in den physikochemischen Eigenschaften der Spaltstücke 26

VI. Ergänzende Beobachtungen und Versuche 28
1. Verhinderung der Kontraktion in destilliertem Wasser 28
2. Restitutionsversuche in verdünnter Essigsäure 28
3. Abgrenzung der thermischen Kontraktion gegen die Gewinnung von Tropo- und Prokollagen 29
a) Tropokollagen 29
b) Prokollagen (Orekhovitch) 29
c) Prokollagen (Nageotte) 30

VII. Aminosäureanalysen der Fraktionen 32
1. Analysenplan 32
2. Berechnungsweise der Aminosäure-Resultate 33
3. Ergebnisse 34
a) Bruttoanteil des Proteins 34
b) Aminosäurezusammensetzung 35
c) Folgerung aus der Aminosäurezusammensetzung des Elastoids 46

VIII. Verlängerte Extraktion des Elastoids = Ω -Elastoid 47
1. Ausführung der Versuche 47
2. Aminosäurezusammensetzung der Ω-Elastoide 50
a) Junges Sehnenmaterial 51
b) Altes Sehnenmaterial 51

IX. Aminosäurezusammensetzung der niedermolekularen Kontraktionsfraktionen und des Waschwasserrückstandes 65
1. K-Dialysate 65
2. Untersuchung des Waschwasserrückstandes 67
a) Vorbemerkung 67
b) Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils 67
c) Niedermolekularer Anteil der "Interstitialflüssigkeit" 67
3. Aminosäurezusammensetzung von "Tropo- und Prokollagen" 69
4. Unidentifizierte Peaks und Aminozucker 72

X. Diskussion 77
1. Das physikalische Modell der Kontraktion 77
2. Modifizierte Auffassung des Alterns 79
3. Vergleich unserer Ergebnisse mit Ergebnissen bei löslichem Kollagen 80
4. Hypothesen 82

XI. Zusammenfassung 83

Tabellen 85

Literaturverzeichnis 111

I. Einleitung

1. Zur Definition des Begriffes "Kollagen"

Die umfangreiche Literatur über das Kollagen darf nicht über die Tatsache hinwegtäuschen, dass ein abgerundetes und allen experimentellen Befunden Rechnung tragendes Bild über die Struktur dieses Naturstoffes heute noch nicht vorliegt.[1] Besonders merkwürdig berührt es, dass kaum ein Autor seiner Arbeit eine Definition des Terminus "Kollagen" im Sinne einer klaren und verbindlichen Begriffsabgrenzung vorausschickt. Dabei lässt sich leicht zeigen, dass fast allein schon durch das Wort "Kollagen" ein Stoff umschrieben wird, der auf Grund vieler Eigenschaften eindeutig gegen alle anderen Naturstoffe abgegrenzt ist.

Wir können als Kollagen (das "Leimbildende") jenen nativen Stoff auffassen, aus dem man Leim gewinnen kann, wobei wir als "Leim" = Gelatine das aus tierischem Gewebe gewonnene Protein bezeichnen, das in wässriger Lösung zur Bildung einer schmelzbaren, beim Eintrocknen stark klebenden Sülze fähig ist.[2] Diese sich an die etymologische Definition anlehnende Bestimmung deckt sich nun auffallend gut mit der üblichen Auffassung, dass Kollagen, ein hochmolekularer, zur Hauptsache proteinartiger "Festkörper", das biegsame, aber aussergewöhnlich längenkonstante Strukturelement tierischen Bindegewebes ist.[3] Streng genommen genügen die genannten Eigenschaften bereits zur völlig eindeutigen Festlegung, welche Gewebsart wir also mit "Kollagen" bezeichnen. Die Ergiebigkeit*) der Definition leuchtet ein, wenn man bedenkt, dass Kollagen (im Unterschied beispielsweise zum Elastin**)[4] eine typische Aminosäurezusammensetzung[5] (auffallend viel Gly, Pro und Hypro) und eine typische Röntgeninterferenz von 2,86 Å aufweist.[6]

Viele Arbeiten über Kollagen fussen offensichtlich stillschweigend auf der gegebenen Definition; sie setzen "Kollagen" als identisch mit dem nativen Festkörper, wie er beispielsweise in einer Sehne vorliegt. Bei Versuchen, näheres über die chemische Zusammensetzung eines hochmolekularen Festkörpers zu erfahren, ist es naturgemäss nicht zu umgehen, diesen irgendwie in Lösung überzuführen. Die Nomenklatur für ein so erhaltenes "Derivat" steht natürlich frei, doch halten wir es für irreführend, dieses ebenfalls mit Kollagen zu bezeichnen. Selbst wenn das Derivat noch spezifische Merkmale des nativen Produktes aufweist (z.B. elektronenmikrosko-

---

*) Eine Definition ist an sich willkürlich, d.h. weder "falsch noch richtig", kann aber mehr oder weniger zweckmässig oder ergiebig sein, in dem Sinne, dass der umschriebene Begriff ausser den ihn bestimmenden noch eine Reihe weiterer typischer Merkmale einschliesst.

**) Elastisches, z.B. im Nackenband (Ligamentum nuchae) vorkommendes Bindegewebe.

pische 640 Å Periode im Falle des wiedergefällten sog. Prokollagens), ist die Identität mit dem ursprünglichen Körper verlorengegangen. Es hat sich überdies gezeigt, dass, je nach der Vorschrift, nach der der native Körper in Lösung gebracht und wieder gefällt wird, das Derivat sehr verschiedene Eigenschaften aufweisen kann.[7] Bei Vergleichen von Arbeiten, die sich z.B. auf sog. gereinigtes Kollagen[8] beziehen, und von Studien wie den unseren, die von nativen Festkörpern ausgehen, ist also immer zu beachten, dass von zwei verschiedenen Dingen die Rede ist. Wir bestreiten die Möglichkeit keineswegs, dass der eine oder andere Kollagenextrakt, z.B. Prokollagen (Citratpuffer-Extraktion),[9] für einzelne Eigenschaften des nativen Stoffes sehr gut repräsentativ sein kann, z.B. für die Aminosäuren-Zusammensetzung, doch müsste dieser Nachweis in jedem einzelnen Fall erbracht werden.

Obschon nach dem Gesagten die Festlegung auf das Ausgangsmaterial "natives Kollagen" einleuchtet und folgerichtig erscheint, ist in der Praxis doch noch eine weitere Präzisierung nötig. Anatomisch ist ja Kollagen im Organismus mitunter eng mit anderen Gewebeteilen (Muskel, Fett, elastisches Gewebe usw.) verbunden, im Falle des Knochens sogar mit unlöslicher anorganischer Substanz durchsetzt. Man wählt mit Vorteil Organe, bei welchen das Herauspräparieren der anatomischen Einheit Kollagen möglichst einfach und sauber gelingt, wie z.B. bei der Schwanzsehne einer Ratte. Diese Sehnen sind in situ, wie ja fast alle Organe, mit einer Interstitialflüssigkeit durchsetzt, die sich aber durch einfaches Wässern in der Kälte entfernen lässt. Was übrig bleibt, ist ein Körper, der sich weder im Aussehen noch in den mechanischen Eigenschaften von der mit dem Organismus verwachsenen Sehne unterscheidet. Wir haben überdies gezeigt*), dass die Zusammensetzung der auswaschbaren Substanz chemisch gänzlich von derjenigen des Kollagens verschieden ist.

Wir glauben somit hinreichend begründet zu haben, weshalb wir als Ausgangsmaterial unserer Versuche sauber präparierte, kalt mit Wasser gewaschene Rattensehnen verwenden und dieses Ausgangsmaterial als "natives Kollagen" bezeichnen.

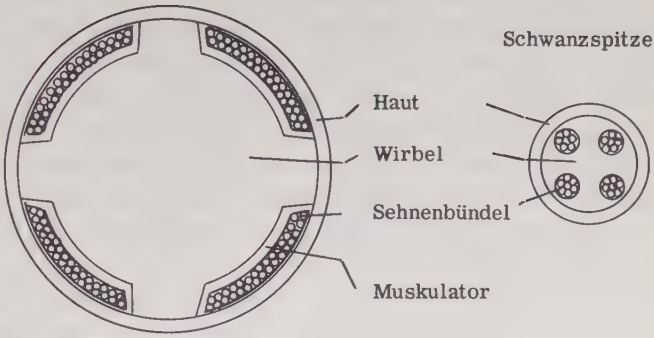
2. Bestehende Ansichten über den Aufbau des Kollagens

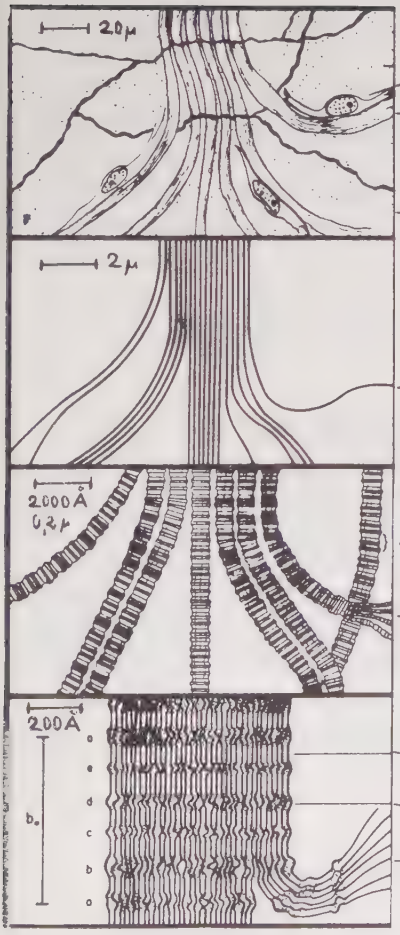
Zerfasert man ein Sehnenbündel, so erkennt man dessen Aufbau aus zusammenhängenden einzelnen Sehnen, die sich schrittweise in wiederum unter sich fester verbundene, dünnere Fäden auftrennen lassen. Dieser stufenweise Aufbau ist in Abb. I näher beschrieben. Als kleinste molekulare Einheiten liegen offensichtlich zur Faserrichtung parallel verlaufende Peptidketten vor. Man nimmt an, dass die einzel-

---

*) siehe weiter unten (Seite 65)

Ia Querschnitt durch einen Rattenschwanz





Ib Mikroskopische Stufe
Fibroblast
Primitivfaser
Elastische Faser
Grundsubstanz

Ic Ultramikroskopische Stufe
Fibrille

Id Elektronenoptische Stufe
axiale Periode
Subfibrille oder Filament

Ie Röntgenoptische Stufe
Interband
Band
Protofibrille

Abb. Ia - Ie

nen Peptidketten eine besondere, durch den grossen Anteil an Iminosäuren bedingte Spiralform besitzen. In der Längsrichtung gemessen folgen die einzelnen Peptidbindungen mit einer Periode von 2,86 Å aufeinander, einem Abstand, der aus Röntgendiagrammen nativen Kollagens und auch wiedergefällter Derivate zu erkennen ist.[6] Es liegen über den Aufbau des Kollagens verschiedene Strukturmodelle vor,[11] doch entspricht dasjenige von Rich und Crick[12] am ehesten dem nativen Gebilde. Mit grosser Wahrscheinlichkeit sind je drei Peptidketten besonders eng zusammengeschlossen und seilartig verdrillt, wobei eine Umdrehung dieser übergeordneten Spirale nach 30 mal 2,86 = 85,5 Å vollständig ist (Abb. II).

Die in Abb. I als Fibrille bezeichnete Untereinheit der Kollagenfaser von ca. 900 Å Durchmesser zeigt im Elektronenmikroskop eine Querstreifung[14], d.h. eine periodische Aenderung sowohl des Durchmessers als auch der Anfärbbarkeit durch Schwermetallanionen.[15] Die Abstände von Streifen zu Streifen sind unterschiedlich in der Grösse von 50 - 100 Å; eine Sequenz von etwa 10 bis 14 Hauptstreifen wiederholt sich aber mit grosser Regelmässigkeit nach je etwa 640 Å. Diese im elektronenmikroskopischen Bild gut erkennbare Periode ist so ausgeprägt, dass sie auch in einer 640 Å entsprechenden Interferenz bei Röntgenkleinwinkel-Streuungsmessungen[16] zum Ausdruck kommt. Der in der Faserlängsrichtung periodisch wechselnden Anfärbbarkeit muss ein wenn auch geringer Unterschied in der chemischen Struktur entsprechen. Bear sowie Grassmann[17] vermuten, dass die dunkeln Querstreifen, die sog. Bands, ungeordnete Bereiche darstellen, mit vorwiegend schweren und polaren Aminosäuren, während die hellen Streifen, die Interbands, geordnete kristalline Bereiche aus leichten Aminosäuren, wie Gly, Pro und Hypro, darstellen.

3. Lösliche und umgefällte Kollagenderivate

In einem grossen Teil der in der Literatur beschriebenen Studien wird das native Protein zuerst in Lösung gebracht, was besonders bei Kollagen sehr junger Tiere verhältnismässig leicht möglich ist. Wie schon erwähnt, kann aus solchen Extraktionslösungen wieder ein Produkt ausgefällt werden, das einige Eigenschaften des nativen Körpers, nämlich faseriges Aussehen, die erwähnte Röntgeninterferenz von 2,86 Å und die elektronenmikroskopische Querstreifung zeigt. Bei der Fällung kann die Periodenlänge durch Zugeben von sauren Mukopolysacchariden, Glykoproteiden, Adenosin-Triphosphorsäure oder Nucleinsäuren usw.[7] beeinflusst werden.

IIa

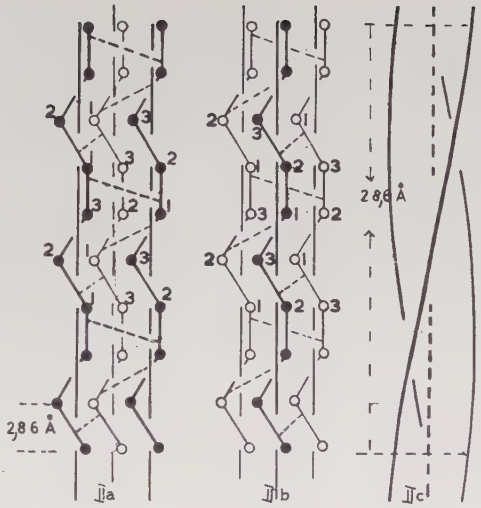
Drei Polypeptidketten, wovon eine hinter den zwei anderen liegt. Diese Anordnung wird als Kollagen I bezeichnet.

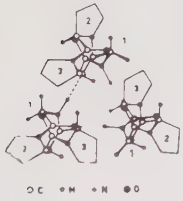
IIb

Drei Polypeptidketten, wovon aber eine vor den beiden anderen liegt = Kollagen II. Die Zahlen 1, 2 und 3 bezeichnen die Lagen der Seitenketten, gestrichelte Linien stellen die Wasserstoffbrücken dar.

IIc

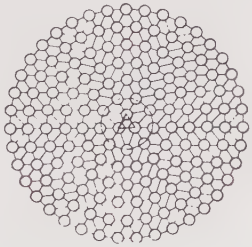
Drei Peptidspiralen, die wieder ihrerseits zu einer übergeordneten Spirale verdrillt sind = coiled-coil.





IId

Die Zahlen können bedeuten : 1 nur Gly, 2 jede Aminosäure, einschliesslich Pro und Hypro, 3 jede Aminosäure, einschliesslich Pro und Hypro, ausser Val und Ileu.



IIe [13]

Anordnung der Protofibrille in einer Kollagenfibrille [13]

Schematische Anordnung einer Fibrille im Querschnitt. Jeder Kreis bedeutet eine aus drei Molekülketten bestehende Protofibrille. Bei der Bildung der Fibrille baut sich das Ganze um einen Kern aus drei Protofibrillen offenbar in der Weise auf, dass sich, vergleichbar etwa dem Dickenwachstum eines Baumes, immer wieder eine neue Schicht von Protofibrillen aussen anlagert. Die Abstände von einem Protofibrillenmittelpunkt zum nächsten betragen bei der trockenen Fibrille ca. 12 Å, können aber bei der Quellung der Faser bis zu 18 Å gross sein.

Abb. IIa - IIe Strukturmodelle des Kollagens [12]

Als Tropokollagen*)[18] wurde ein Extrakt bezeichnet, den man beispielsweise aus Haut durch Extraktion mit verdünnter Kochsalzlösung und neutralen oder basischen Phosphatpuffern erhält, der dann durch Dialyse gegen Wasser usw. gefällt werden kann, während Prokollagen[19] das Produkt darstellt, welches durch kalte Extraktion mit saurem Citratpuffer oder verdünnter Essigsäure[20] erhalten wird. Aus verschiedenen Beobachtungen ist gefolgert worden, dass Tropokollagen derjenige Stoff sei, der primär von den Fibroplasten ausgeschieden werde und in einer extrazellulären Nachreifung über das Prokollagen schliesslich in das eigentliche Kollagen übergehe.[23]

Ueber Teilchengrösse und Form von gelöstem Prokollagen ist mit Hilfe der Ultrazentrifuge und durch Streulichtmessungen verschiedenes bekannt geworden. Boedtker und Doty[24] fanden, dass in frischen Lösungen von Tropokollagen fadenförmige Teilchen von einer Länge von 2600 - 3000 Å, einem Durchmesser von 14 Å (was der erwähnten dreifachen Kette entspricht) und einem Molekulargewicht von 350'000 vorhanden sind. Bei Prokollagen aus Fischblasen fanden Gallop[25] und andere Forscher[26] ein Molekulargewicht von 10^6 und mehr. Mässiges Erwärmen einer frischen Prokollagenlösung führt zu einem von den Forschern als Denaturierung bezeichneten Prozess, wobei neue Komponenten entstehen.[27] Orekhovitch und Shpikiter[28] fanden in dieser denaturierten Lösung durch analytisches Ultrazentrifugieren zwei Komponenten mit verschiedenem Molekulargewicht (80'000, 120'000).**)

Versuche zur Konstitutionsermittlung durch partiellen Abbau der Peptidketten (auch enzymatisch) und Charakterisierung der Bruchstücke haben bloss zu einem fragmentarischen Einblick in die Aminosäuresequenz geführt.[31] Was die nichtproteinischen Anteile des Kollagens betrifft, ist das Vorkommen verschiedener Kohlehydrate als sicher anzunehmen.[32] Umstritten ist hingegen die Rolle eingebauter Neutralzucker[33] bei den wiedergefällten kollagenartigen Produkten. Bemerkenswert ist jedoch, dass durch Zusätze von oben angeführten Stoffen der submikroskopische Habitus der Partikel entscheidend beeinflusst werden kann.[7]

---

*) Das durch Neutralsalzextraktion und das durch saure Extraktion gewonnene, gelöste Kollagen scheinen chemisch und physikalisch identisch zu sein. Beide Lösungsformen lassen sich, und zwar quantitativ, wieder in Fasern mit der normalen Querstreifung des Kollagen (640 Å) überführen (F.O.Schmidt, 1959).[21] Deshalb wird nach J. Gross, J.H. Highberger und F.O. Schmidt (1954)[22] auch das durch saure Extraktion gewonnene Kollagen als Tropokollagen bezeichnet, wobei man dieses als ein "Monomeres" des Kollagens auffasst, das sich zu fertigen Fasern des Kollagens zusammenordnen kann.

**) Diese Molekulargewichte unterliegen je nach der Gewinnungsart der Derivate grossen Schwankungen. Solche Komponenten wurden schon von Northrop[29] im Jahre 1926 in Gelatinelösung gefunden. Grassmann und Mitarbeiter[30] fanden, dass bei der Wärmedenaturierung der grösste Teil der Moleküle in zwei Komponenten vom Molekulargewicht 115'000 ± 10% bezw. 215'000 ± 10% zerfällt.

4. Die thermische Kontraktion[34a)]

Die Besprechung eines schon sehr lange bekannten Phänomens, nämlich der thermischen Kontraktion von Kollagen, soll im folgenden Abschnitt als Ueberleitung zu den Arbeiten aus unserem Laboratorium dienen.

II. Die thermische Kontraktion

1. Das Phänomen der thermischen Kontraktion

Die grundlegende Beobachtung, von welcher unsere Versuche ausgehen, war schon im Jahre 1871 Gegenstand einer wissenschaftlichen Studie von Rollet.[34] Wird eine Sehne in Wasser erwärmt, so tritt bei 65° plötzlich eine starke Verkürzung ein ("Zusammenschnurren"), wobei die Sehne das ursprünglich opaleszente Aussehen verliert, sich verdickt und glasig wird. Schon Rollet wies darauf hin, dass die visuell beobachtbaren Veränderungen ausbleiben, wenn das Zusammenschnurren durch Befestigen der Enden verhindert wird.

Ewald[35] zeigte, dass die Kontraktion bei Temperaturen, die nur um wenige Grade tiefer als 65° liegen, zwar auch stattfindet, jedoch sehr verlangsamt; d.h. bei 60° erstreckt sich der (bei 65° plötzliche) Kontraktionsvorgang z.B. über ein Intervall von ca. 2 Stunden.

Weir[36] versuchte später, diese Temperaturabhängigkeit des zeitlichen Ablaufs quantitativ zu beschreiben und extrapolierte in Gedanken das Experiment auf 37°. So konnte er die Auffassung vertreten, die natürliche Alterung sei mit einem extrem verlangsamten, d.h. sich über das ganze Leben erstreckenden Kontraktionsvorgang zu vergleichen.

Ewald zeigte ferner, dass auch der Elektrolytgehalt[35, 37] des wässrigen Mediums den Kontraktionsvorgang wesentlich beeinflusst. Im Prinzip bewirkt eine Elektrolytvermehrung gleichsinnige Wirkung wie Temperaturerhöhung. Z.B. setzt 40 % Kaliumjodid die Kontraktionstemperatur gegenüber Wasser von 65° auf ca. 20° herab.[38] Erwartungsgemäss hängen die Kontraktionsbedingungen auch von der Art des Kollagens und der Tierklasse ab; beispielsweise laufen die analogen Vorgänge bei Fischkollagen bei tieferen Temperaturen ab.[39]

Gustavson setzt diese grössere Kontraktionsneigung des Fischkollagens direkt mit dessen geringerem Gehalt an Hydroxyprolin (weiter unten als "Hypro" abgekürzt) und Prolin in Beziehung.[39]

Wöhlisch[40] sah in der thermischen Kontraktion eine Umwandlung des Kollagens in die Modifikation "Kollagen II", womit er anfänglich den glasigen isotropen Zustand der Faser nach der Kontraktion bezeichnete. Er fand dann, dass der Vorgang endotherm verläuft und dass sich der Umwandlungspunkt zu höheren Temperaturen verlagert, wenn eine an die Faser gelegte und bei der Kontraktion zu überwindende Zugspannung vergrössert wird. Er schloss daraus, dass diese "Umwandlung" ein im thermodynamischen Sinn reversibler Vorgang sei. Er bemerkte auch, dass sich beim Verreiben von Kollagenfasern bei 60° (in 0,9% NaCl-Lösung)

eine "Gelatine" bildet. Seine Schlussfolgerung, dass deswegen Kollagen II mit Gelatine identisch sei, ist heute nicht mehr ganz verständlich. Sie stimmt nicht mit dem von uns erhobenen Befund überein, wonach bei der Kontraktion ebenso wie in der nachfolgenden Dilatation der Faser ein Teil des Materials als (im Rahmen der Versuchsbedingungen) unlöslicher glasiger "Gerüstfaden" (sog. "Elastoid" nach Verzár[41]) übrigbleibt.

Verzár und Mitarbeiter beschrieben, dass die Faser bei der thermischen Kontraktion eine Substanz in das umgebende Wasser abgibt, ohne allerdings auf deren gelatineartigen Habitus aufmerksam zu machen.[41]

Als Kennzeichen für den Substanzaustritt wies Verzár Hydroxyprolin[42] und Glukosamin[42] im umgebenden Wasser durch die Neumann-Logan-Reaktion[43] mod. nach Martin und Axelrod[44] bzw. Elson und Morgan,[45] mod. nach Boas,[46] nach.

Kontraktionsversuche an Sehnen, die von Ratten verschiedenen Alters stammten, ergaben, dass sowohl die bei der Kontraktion auftretende Kraft als auch die Menge der austretenden Substanz in charakteristischer Weise vom Alter abhängt. (Siehe Seiten 22 und 47.) Vereinfacht formuliert üben ältere Sehnen bei der Kontraktion grössere Kräfte aus, geben aber weniger Substanz ab als jüngere.[47] In einer weiteren Arbeit von Verzár und Meyer wird als Mass der Substanzabgabe auch das Gewicht des Trockenrückstandes, der nach der Kontraktion in Wasser gefunden wird, herangezogen.[42]

2. Unsere Problemstellung und Versuchsanordnung

In der vorliegenden Arbeit suchten wir zunächst mehr über die Natur der als Folge der thermischen Kontraktion auftretenden Kollagenbruchstücke zu erfahren, um diese Kenntnis dann bei der Beschreibung der qualitativen und quantitativen Unterschiede, die durch die verschiedenen Tieralter bedingt sind, anzuwenden. Unsere Versuchsanordnung (Abb. III) war sehr einfach: Die "Sehnen", d.h. ein oder mehrere der insgesamt 4 Sehnenbündel, die sich aus einem Rattenschwanz herauspräparieren lassen, werden durch ein Glasrohr gezogen und an dessen unterem, durch einen Stopfen verschlossenem Ende befestigt. Das obere Ende der Sehnen wird durch einen über eine Rolle geführten und ein kleines Gewicht tragenden Faden gestrafft gehalten.

Das Glasrohr wird mit der Elutionsflüssigkeit, in unserem Falle meist mit reinem Wasser, gefüllt und in ein Wasserbad mit der gewünschten Temperatur, also

64 - 65°, gebracht. Ein rascher Temperaturausgleich wird mittels durch das Rohr geperlter Luft erzielt. Die Sehnen beginnen sich nun mit den typischen Begleiterscheinungen - glasigwerden und unregelmässige, durch Einschnürungen unterteilte Verdickung - zu verkürzen. Nach wenigen Minuten ist die minimale Länge erreicht und die glasigen Fäden beginnen sich wieder, beinahe ohne an Durchmesser einzubüssen, also unter zusätzlicher Quellung, zu strecken und haben nach weiteren ca. 45 Minuten eine konstant bleibende Länge erreicht.

Wir untersuchten dann die verschiedenen "Kontraktionsfraktionen", d.h. einerseits die in die Badflüssigkeit bzw. in das Wasser übergegangenen Substanzen und andererseits den gequollenen, aber unlöslichen Rückstand der Faser.

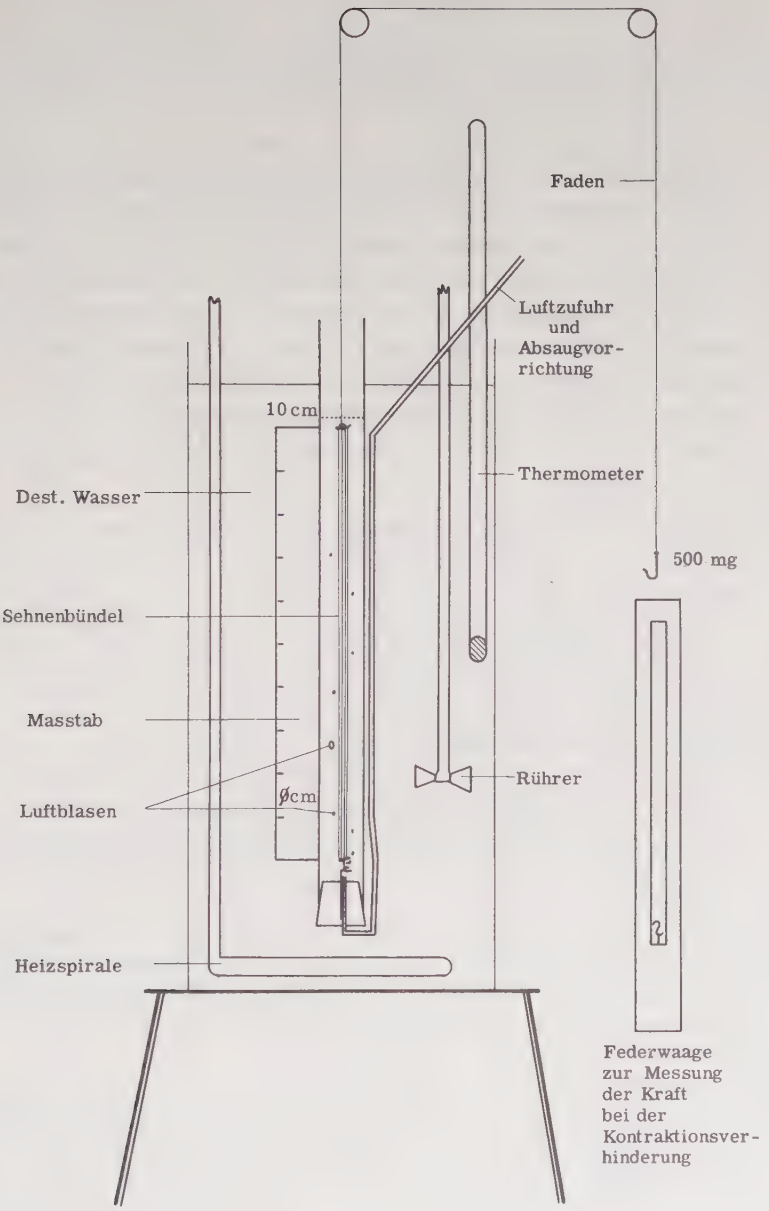


Abb. III Versuchsanordnung

III. Vorläufige Kennzeichnung der Spaltstücke

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen seien im folgenden - der ausführlichen Beschreibung vorgreifend - kurz zusammengefasst.

a) Der grösste Teil sowohl der bei der Kontraktion als auch bei der Wiederverlängerung austretenden Substanz ist nicht dialysierbar, hat Proteinnatur und unterscheidet sich äusserlich kaum von Gelatine, es sei denn durch anscheinend kleineren Abbaugrad: Unsere Substanz geliert nämlich schon bei etwa dreimal kleineren Konzentrationen als gewöhnliche Handelsgelatine. Im Gegensatz zu den als Prokollagen und Tropokollagen bezeichneten, aus Kollagen durch Elektrolytextraktion erhaltenen hochmolekularen Körpern[48], zeigt unsere Substanz keine Einsalzeffekte, ist also in reinem Wasser als Kolloid löslich. Wir bezeichnen deshalb unsere Substanz wegen dieser Eigenschaft, die sie mit Gelatine gemeinsam hat, als Kontraktions- oder "K-Gelatine".

b) Auch wenn die Sehne durch erschöpfende Wässerung vor dem Kontraktionsversuch von Interstitialflüssigkeit befreit wurde*), tritt nach der Kontraktion ausser der Gelatine eine niedermolekulare, d.h. dialysierbare Substanz in das umgebende Wasser aus. Deren Menge beträgt etwa 4 - 6 % des ursprünglichen Sehnentrockenmaterials. Chemisch besteht sie zu einem wesentlichen Teil aus Peptiden**) und wenigen Aminosäuren.

c) Das Material, das nach der Kontraktion übrigbleibt, das Wöhlisch ursprünglich als "Kollagen II" bezeichnete, wurde von Verzár "Elastoid" genannt. Mit dieser Bezeichnung wird auf die in feuchtem Zustand beobachtbare gummiartige Elastizität hingewiesen, welche auch jener des Elastins, eines anderen Bindegewebsproteins, das keine kollagenen ("leimbildenden")

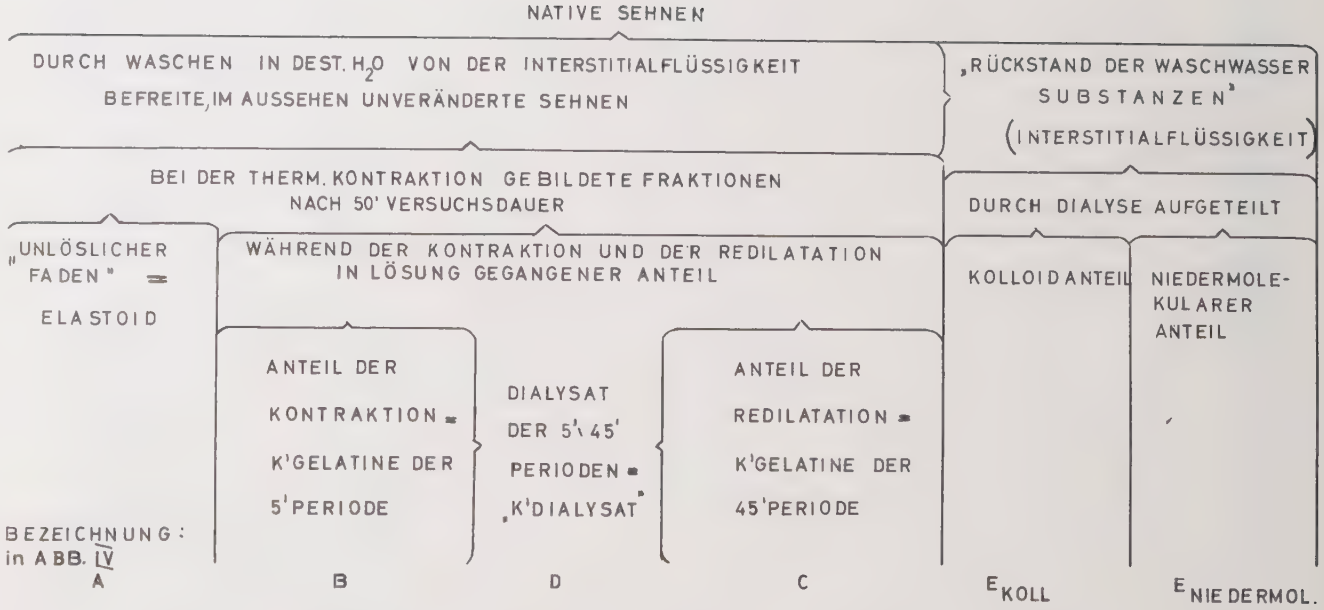
---

*) Wir haben uns überzeugt, dass der Kontraktions-Vorgang, einschliesslich aller Begleiterscheinungen, völlig unabhängig davon verläuft, ob man mit einer frisch präparierten oder aber mit einer gründlich (48^h bei 4^o) gewässerten Sehne arbeitet. Wir zogen für unsere Versuchsreihe gewässerte Sehnen vor, um die chemischen Analysen der auftretenden Fraktionen nicht durch die vorhandene "Interstitialflüssigkeit" zu verfälschen.

**) Um Missverständnisse beim Vergleich mit früheren Arbeiten auszuschalten, sei erwähnt, dass wir im unter b) erwähnten niedermolekularen Substanzteil nur verschwindend wenig Hypro nachweisen konnten; dagegen enthält die unter a) genannte Gelatine, ähnlich wie die gewöhnliche Gelatine, Hypro als einen wesentlichen Proteinbestandteil. Da die Neumann-Logan Reaktion bei standardisierter Ausführung einen verhältnismässig gut reproduzierbaren Bruchteil des im Proteinverband vorliegenden Hypro erfasst, können in früheren Versuchen (Verzár[41]) die Hypro-Bestimmungen als ein Mass für die vorliegenden Mengen an K-Gelatine aufgefasst werden.

Eigenschaften aufweist, ähnlich ist.

Eine Uebersicht über die Aufteilung des Kollagens bei der thermischen Erwärmung in Fraktionen, die nach einem insgesamt 50 Minuten dauernden Versuch anfallen, gibt Schema 1.



Schema 1 Aufteilung der nativen Sehne in Fraktionen bei der thermischen Kontraktion

IV. Einfluss des Versuchstieralters auf die thermische Kontraktion

1. Vorbemerkung

Zur Beschreibung der altersbedingten Unterschiede des Verhaltens der Sehnen im Kontraktionsversuch ist es zweckmässig, den Vorgang in die bereits angedeuteten charakteristischen Phasen aufzuteilen.

a) Die eigentliche Kontraktion (wobei sich die durch ein kleines Gewicht eben gestreckt gehaltene Faser auf ca. 30 % der ursprünglichen Länge verkürzt) spielt sich, wenn man als Badtemperatur $64^{\circ} \pm 1^{\circ}$ wählt, in etwa fünf Minuten ab; es ist möglich, die in dieser kurzen Phase an das Badwasser abgegebene Substanz durch rasches Erneuern des Bades getrennt aufzufangen.

b) Nach Erreichen der minimalen Länge beginnt sich die Sehne unter dem Einfluss des erwähnten kleinen Gewichts langsam wieder zu verlängern und gibt dabei weitere K-Gelatine an das Wasser ab.

c) Spätere Versuche haben ergeben, dass nach den unter a) und b) angegebenen Zeitabschnitten (zusammen 50 Minuten) zwar die mechanische Verlängerung der Sehne, nicht aber der Austritt von K-Gelatine abgeschlossen ist. Die Abgabe weiterer Gelatine an das Badwasser dauert, wenn auch stetig langsamer werdend, gegen 50 Stunden an (vgl. Seite 47). Wir bezeichnen den nach derartig verlängerter Extraktion übrig bleibenden unlöslichen Faden als "Ω-Elastoid".

Im folgenden wird, sofern das Tieralter nicht näher angegeben ist, als "junges Tier" eine ca. 6 - 8 Monate alte, also schon geschlechtsreife Ratte bezeichnet, als "alt" bezeichnen wir 28 - 36 Monate alte Tiere, d.h. solche, die bereits nahe dem mittleren natürlichen Sterbealter gesunder Ratten sind.

Der äussere mechanische Ablauf der thermischen Kontraktion zeigt folgende Abhängigkeit vom Tieralter:

Sehnen "sehr junger", d.h. bloss 2 - 5 Monate alter Tiere, kontrahieren in der ersten Phase nicht so stark wie diejenigen erwachsener Tiere, nämlich nur auf etwa 50 % der ursprünglichen Länge. Jedoch sind die Unterschiede zwischen erwachsenen "jungen" (6-8 Monate) und "alten" (30 Monate) Tieren - beide Gruppen kontrahieren wie erwähnt auf ca. 30 % - in der ersten Phase bei unserer Versuchsanordnung (kleines Vorspanngewicht) kaum bemerkbar. (Die auf Seite15 erwähnte Beobachtung Verzár bezieht sich auf die grössere Kraft der Kontraktion von Sehnen älterer Tiere.)

Dagegen erfolgt in der Dilatationsphase die Verlängerung der Faser bei jungen Tieren merklich rascher und ausgiebiger als bei alten Tieren, d.h. eine junge, eben kontrahierte Faser verlängert sich innerhalb von ca. 20 Minuten auf wieder 70 % der ursprünglichen Länge; eine alte braucht dagegen 40 Minuten, um wieder 50 % zu erreichen.

2. Mengenunterschiede

Ein weiterer bedeutender Unterschied zwischen "jungen" und "alten" Tieren[49)] ergibt sich aus der Menge der während eines 50 Minuten dauernden Kontraktionsversuches abgegebenen K-Gelatine. Ganz allgemein geben Sehnen von älteren Tieren bei der Kontraktion weniger davon ab als jene von jungen.

Das Ergebnis von Mengenbestimmungen bei Kontraktionsversuchen mit Sehnenmaterial verschiedenster Tieralter ist in Abb. IV graphisch dargestellt. Das Tieralter ist auf der Abszisse aufgetragen, die Mengenanteile der Fraktionen sind durch Unterteilung der Ordinaten dargestellt, wobei die Unregelmässigkeit der Einzelergebnisse durch einen möglichst einfachen Streckenzug ausgeglichen wurde.*)

Die Ordinaten (A) zwischen der Altersachse und dem ausgezogenen Streckenzug bedeuten die Mengen (immer in Trockengewichtsprozenten der nativen Sehne) des Elastoids, d.h. des "unlöslichen Gerüsts" der Faser nach einem sich über 50 Minuten erstreckenden Kontraktionsversuch. Dieser Anteil nimmt demnach mit dem Alter zu, und zwar zuerst wenig (von 10% auf 25%) im Adoleszenzalter, um im mittleren Alter annähernd konstant zu bleiben (25%) und mit der Seneszenz bis gegen 80 % anzusteigen.

Die anderen Fraktionen sind wie folgt dargestellt:

Das Band (E) über der strichpunktierten (-.-.-.) Linie zuoberst bei ca. 96 % bedeutet den Trockenanteil der nativen Sehne der sich beim kalten Wässern (2^h bei 4^o) aus der Sehne herauslösen lässt. Somit stellen die Ordinatenanteile oberhalb der ausgezogenen bis zur strichpunktierten Linie die Menge Substanz dar, die bei der Kontraktion in Lösung gegangen ist (B+C+D). Das Band (D) zwischen ---- und -.-.-.-.

*) Beim Approximieren einer Punktschar durch aneinandergereihte Strecken verschiedener Neigung ist die Wahl der Abszissenabschnitte zunächst eine Frage des Ermessens, scheint also ein Willkürakt zu sein. Ermittelt man aber streckenweise die Regressionskoeffizienten, so lässt sich durch Vergleich der Fehlerquadratssumme, die bei der gewählten Einteilung resultiert, mit derjenigen irgendeiner anderen Einteilung in gleich viele Abschnitte zeigen, dass die Wahl optimal war. Die Willkür besteht also nur darin, dass man sich überhaupt entschliesst, die Punkte durch einen Zug von 3 Strecken zu approximieren.

bedeutet den dialysierbaren Anteil der bei der Kontraktion in Lösung gegangenen Stoffe. Das Feld (B+C) zwischen dem ausgezogenen Strich und ----- stellt die Menge der K-Gelatine dar. Es ist zudem noch unterteilt (-/-/-) in den Anteil (B), der schon in den ersten 5 Minuten bei der Kontraktion in Lösung geht und in den Teil (C), der erst während der Dilatationsphase austritt. Das Mengenverhältnis (5-Minutenanteil pro Gesamtgelatine) beträgt bei ganz jungen Tieren ca. 50 %, nimmt dann mit der Adoleszenz rasch ab, um etwa vom 12. Altersmonat an (unabhängig von der spätaltersbedingten Gesamtverminderung der Gelatine) nur noch den annähernd konstanten Bruchteil von 12,4 $\pm$ 4,5 % aller Gelatine auszumachen

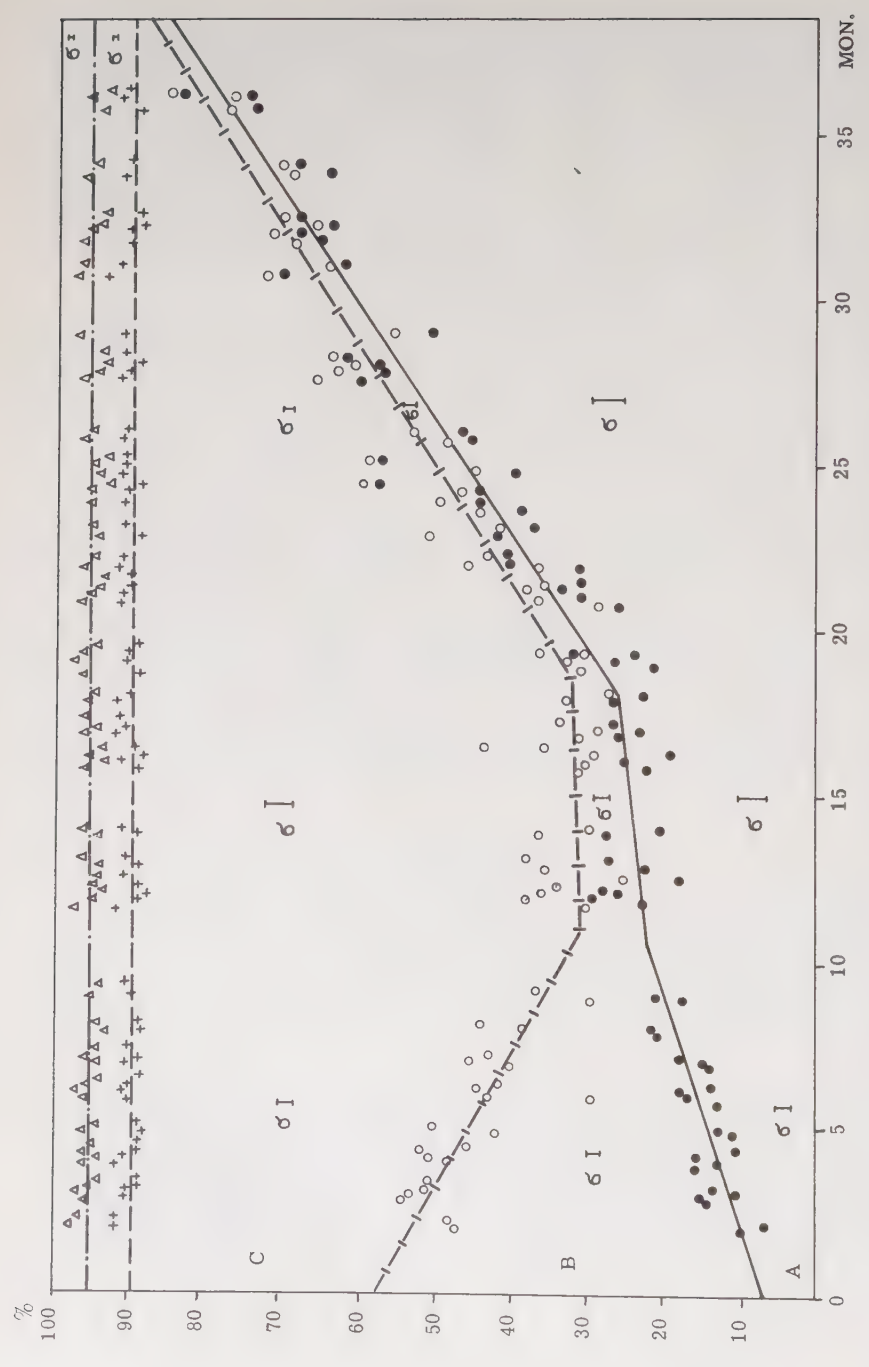


Abb. IV Altersabhängigkeit der Aufteilung des Kollagens in Fraktionen

Legende zu Abb. IV

Altersabhängigkeit der Aufteilung von Sehnenkollagen in Fraktionen bei der thermischen Kontraktion (Versuchsdauer 50').

100% = Trockengewicht der nativen Sehne, inkl. "Interstitialflüssigkeit"

Feld	Trockengewichtsanteil
A	des Elastoids
B	der K-Gelatine der Kontraktionsphase (erste 5 Minuten)
C	der K-Gelatine der Redilatationsphase (folgende 45 Min.)
D	des dialysierbaren Anteils der bei der thermischen Kontraktion in Lösung gehenden Substanz
E	der Interstitialflüssigkeit

Die Standardabweichung σ (halbe Fehlerbreite der Einzelmessungen) ist als senkrechter Strich in die Felder eingezeichnet.

V. Altersbedingte Unterschiede in den physikochemischen Eigenschaften der Spaltstücke

Die Frage, ob natives Sehnenkollagen eine chemische Einheit darstellt und ob die Aufteilung in die beiden hochmolekularen Komponenten durch die (unphysiologische) Kontraktion ein Artefakt ist oder ob zwei oder mehr verschiedene strukturelle Einheiten bereits nur noch getrennt werden müssen, soll vorerst offen bleiben. Keinesfalls soll der Sprachgebrauch "Komponenten des Kollagens" der Beantwortung dieser Frage vorgreifen.

Man wird sich nun die Frage stellen, ob ein Altersunterschied nicht nur in der Austrittsgeschwindigkeit der K-Gelatine bzw. im Mengenverhältnis der einzelnen Komponenten nach 50 Minuten, sondern auch in deren Eigenschaften zutage tritt. Sehen wir von den weiter unten zu besprechenden Eigentümlichkeiten der Komponenten in der Aminosäurezusammensetzung vorerst ab, so lassen sich folgende Unterschiede schon äusserlich beobachten:

Das Elastoid aus Sehnen junger Tiere erweckt in gequollenem Zustand den Eindruck eines viel zarteren, weniger reissfesten Gebildes als dasjenige alter Tiere, auch wenn man von der trivialen Ursache, dass es aus weniger Trockensubstanz besteht, abstrahiert. Dies äussert sich beispielsweise im Umstand, dass sich die Elastoidfaser eines alten Tieres, ohne zu zerreissen, wieder auf die ganze ursprüngliche Länge dehnen lässt, während ein junges Elastoid bei einem solchen Streckversuch schon bei etwa 80 % der ursprünglichen Länge zerreisst.

Eigentliche Molekulargewichtsbestimmungen an K-Gelatine sind von uns noch nicht ausgeführt worden. Wir vermuten sogar, dass die Definition des Begriffes "Molekulargewicht" Schwierigkeit bereiten dürfte, da es sich um ein typisches hydrophiles Gel handelt, dessen Zusammenhalt - offenbar auf H-Brücken[50)] beruhend - von Temperatur und Elektrolytgehalt abhängt.[51)]

Viskositätsmessungen bei 20° führten auch bei höheren Verdünnungen und Elektrolytzusatz zu schlecht reproduzierbaren Werten; die Durchlaufzeiten nahmen beim Stehen der Lösungen mit der Zeit immer wieder zu, jedoch wurden keine eigentlichen thixotropen Effekte festgestellt. Beim Stehenlassen und Viskosimetrieren bei höheren Temperaturen (30°) war der Effekt der zeitlichen Zunahme zwar etwas weniger ausgeprägt, doch hatten wir Bedenken, die Temperatur noch mehr zu steigern, weil, wie andere Erfahrungen zeigten, höhere Temperaturen die Gel-Eigenschaften irreparabel schädigen.

Die Vermutung ist sehr naheliegend, dass die erwähnte Schwierigkeit, definierte Durchlaufzeiten zu erhalten, typisch für die durch Kontraktion in reinem Wasser

erhaltene K-Gelatine ist. Gewinnt man nämlich aus den gleichen Rattenschwanzsehnen eine Art Prokollagen durch kalte, langdauernde Extraktion mit Citratpuffer, so zeigt dieser Stoff zwar eine höhere Viskosität als K-Gelatine, die zeitliche Zunahme der Viskosität ist aber viel weniger ausgeprägt. Diese Beobachtung weist in die Richtung der Resultate von Gallop[25], welcher an Prokollagen, das er aus Schwimmblasen von Fischen durch langdauernde, kalte Extraktion mit Citratpuffer erhielt, nicht nur auf Grund gut reproduzierbarer Viskositätsmessungen, sondern auch mittels Ultrazentrifuge und Lichtstreuung auf ein wohl definiertes Molekulargewicht (1,67 ± 0,17 Millionen) schliessen konnte.

Wir versuchten deshalb, unsere K-Gelatine durch ihre Gelierfähigkeit zu charakterisieren, was durch Bestimmung der Konzentration geschehen kann, in welcher die Substanz bei Zimmertemperatur "gerade noch ein Gel ist". Um komplizierte Messanordnungen zu umgehen, definierten wir als "Grenzgelierfähigkeit" die Konzentration, bei der ein nach Art von Bakterienröhrchen schräg gegossener (und über Nacht im Kühlschrank zur völligen Erstarrung gebrachter) Gelpfropf nach Wiedererwärmen auf Zimmertemperatur beim Aufrichten der Röhrchen innerhalb 5 Minuten gerade von selbst zusammenzufliessen beginnt.

Wir fanden für die so definierten Konzentrationen von gegen Wasser dialysierter Kontraktionsgelatine 0,40 ± 0,01 % bei alten Tieren und 0,50 ± 0,01 % bei jungen Tieren, gegenüber 1,5 % bei einer Handelsgelatine. Diese ausserordentliche Gelierfähigkeit kommt allerdings lediglich der originalen Kontraktionslösung zu, die ausser der Dialyse gegen Wasser und wenigen Umschmelzoperationen keine weitere Behandlung erfahren hat. Versuche, ein Trockenpräparat zu erhalten, das nach dem Wiederauflösen eine gleiche Gelierfähigkeit aufweist, waren erfolglos. Das Einengen im Rotationsvakuumverdampfer bei bloss 40° führt zu einem Rückstand, der bei erneuter Wasserzugabe teils zu faserigen Partikeln koaguliert, teils zu einer Lösung mit bedeutend schlechterer Gelierfähigkeit führt. Trockenpräparate, die durch Lyophilisieren erhalten wurden, erweisen sich beim teilweisen Wiederauflösen als gleichartig denaturiert, wenn auch in bedeutend geringerem Masse. - Soweit das physikochemische Beobachtungsmaterial, das wir, ebenso wie weiter unten die chemischen Befunde, vorerst ohne jeden Versuch einer Interpretation oder Theorie beschreiben wollten.

VI. Ergänzende Beobachtungen und Versuche

1. Verhinderung der Kontraktion in destilliertem Wasser

Zu unserer Skizzierung der thermischen Kontraktion gehört noch der Hinweis auf einen sehr aufschlussreichen Effekt. Wir fanden nämlich, dass bei einer Sehne, deren Kontraktion verhindert wird, *) bei der Erwärmung auf 65° und darüber (bis 70°) nicht nur, wie schon von Rollet[34] beobachtet, die optischen Veränderungen ausbleiben, sondern auch praktisch keine, d.h. je nach Versuchsdauer höchstens 1 - 2 % Substanz in das umgebende Wasser austritt.[52] Demnach ist der Zerfall der Sehne in K-Gelatine und Elastoid fest an die Notwendigkeit gebunden, sich frei kontrahieren zu können. Eine derartig erhitzte, aber an der Kontraktion verhinderte Sehne unterscheidet sich nach dem Versuch praktisch nicht von einer nativen, gänzlich unbehandelten Sehne, d.h. sie besitzt sowohl deren Aussehen und sehr geringe Längenelastizität als auch deren Fähigkeit, im eigentlichen Kontraktionsversuch sich zusammenzuziehen und Gelatine abzugeben.[53]

2. Restitutionsversuche in verdünnter Essigsäure[54]

Die Sehnen beginnen in verdünnter Essigsäure bei Zimmertemperatur sofort zu kontrahieren. Bei tieferen Temperaturen verläuft dieser Vorgang entsprechend langsamer, wobei ebenfalls eine Komponente der Sehne in Lösung geht (siehe Seite 30). Auch hier lässt sich durch Gestreckthalten das Glasigwerden sowie der Substanzaustritt verhindern. Unsere Versuche führten wir in einer Essigsäurelösung von 0,025 % durch. Wir fanden, dass eine schon eingesetzte Kontraktion durch nachträgliches Anlegen einer grösseren Zugkraft wieder rückgängig gemacht werden kann, wobei die teilweise schon glasig gewordene Faser wieder in den opaken Anfangszustand zurückkehrt. Solche Restitutionsversuche waren nur in kalter (3-4°) verdünnter Essigsäure, nicht aber bei der thermischen Kontraktion erfolgreich.

---

*) Die minimale Kraft, die zur Verhinderung der thermischen Kontraktion als Gegenzug an die Sehnen angelegt werden muss, hängt ausser von der Dicke des Sehnenbündels auch vom Versuchstieralter ab. Bei einer Sehnendicke, die einem Trockengewicht von 4 mg/cm Länge entspricht beträgt der anzulegende Gegenzug minimal etwa 15 (jung) bis 25 (alt) Gewichtsgramme. Die Kräfte zur Verhinderung der Essigsäurekontraktion wurden nicht speziell gemessen, sie scheinen aber von ähnlicher Grösse zu sein.

3. Abgrenzung der thermischen Kontraktion gegen die Gewinnung von Tropo- und Prokollagen

Wir halten es für notwendig, noch den Nachweis zu führen, dass der thermische Zerfall des Kollagens in Elastoid und K-Gelatine etwas wesentlich anderes ist als die in der Kälte durchgeführte Extraktion löslicher Komponenten (Tropo- und Prokollagen).

Abgesehen von ihrer Gewinnungsart lässt sich K-Gelatine nämlich noch auf Grund ihres Mengenanteils und ihrer Eigenschaften gegen Tropo- bzw. Prokollagen abgrenzen. Wir griffen aus den von Autor zu Autor mehr oder weniger variierenden Herstellungsvorschriften von Tropo- bzw. Prokollagen uns typisch erscheinende Verfahren heraus und behandelten demgemäss die Sehnen unseres Rattenstammes unter genauer Verfolgung der Stoffbilanz. Als Analogon zum Tropokollagen der Literatur[18] (Extraktion sehr jungen, kollagenen Materials mit Kochsalzlösung oder neutralem bis schwach alkalischem Phosphatpuffer) stellten wir aus 3 - 4 Monate alten Rattenschwanzsehnen einen Extrakt gemäss folgender Vorschrift her:

a) "Tropokollagen":
Das Sehnenmaterial wurde zuerst bei 4^{o} unter Schütteln je ca. eine Stunde mit reinem Wasser gewaschen und das Waschwasser so oft (4-6 mal) erneuert, bis es klar blieb. Darauf wurden die Sehnen 48^{h} mit einer 0,15-n NaCl-Lösung weiter geschüttelt und dann von der entstandenen Lösung durch Zentrifugieren abgetrennt. Die klare Lösung wurde gegen reines Wasser dialysiert, wobei das "Tropokollagen" in Form von unter dem Mikroskop faserig erscheinender Flocken ausfiel. Die Fällung wurde durch zweimaliges Zentrifugieren und Wiederaufschlämmen in Wasser gewaschen. Die schliesslich wieder zentrifugierte und sofort scharf getrocknete Fällung machte ca. 4/5 der bei der NaCl-Extraktion in Lösung gegangenen Substanz und 4 % des Trockengewichtes der ursprünglichen Sehnen aus.

Als Entsprechung zum Prokollagen nach Orekhovitch behandelten wir unsere Sehnen wie folgt:

b) "Prokollagen (Orekhovitch)":
Wir extrahierten den Rückstand der oben beschriebenen NaCl-Extraktion, der noch durchaus das Aussehen der ursprünglichen Sehne besass, mit einem Citratpuffer (Ionenstärke 0,2, pH 3,7 - 4,0). Die Ausführung der Extraktion und der Fällung war dem oben beschriebenen Verfahren analog.

Wiederum liessen sich 4/5 des in Lösung gegangenen Materials durch Dialyse fällen. Die Ausbeute betrug jedoch nur noch 2 - 3 % des ursprünglichen Sehnenmaterials.

Grössere Ausbeuten an Prokollagen erzielten wir durch Anwendung einer von Nageotte (1927) angegebenen Extraktionmethode mit stark verdünnter Essigsäure:

c) "Prokollagen (Nageotte)":*)
Aus unseren 3 - 4 Monate alten, wie unter a) gewaschenen Sehnen konnten wir mit 0,05-proz. Essigsäure 20 - 30 % des Sehnentrockengewichts in Lösung bringen; allerdings war die Wiederfällung durch Dialyse gegen Wasser verlustreicher als bei a) und b), was z.T. durch die beinahe kolloide Feinheit der ausgefallenen Partikel und die dadurch erschwerte Zentrifugierung bedingt war.

Die Wesensverschiedenheit der 3 beschriebenen Extraktionsmethoden und der thermischen Kontraktion geht also schon aus den sehr unterschiedlichen Ausbeuten an löslichem Material hervor, wobei vor allem auch das Alter des Tiermaterials zu beachten ist. Das Alter der von uns verwendeten Sehnen (3-4 Monate alte Tiere) stellt nämlich einen Kompromiss dar, um überhaupt die kalte und die thermische Extraktionsgewinnung vergleichen zu können. Solche Sehnen, aus denen bei kalter, langdauernder Extraktion 5 %, 2 - 3 %, bzw. 20 - 30 % löslichen Materials gewonnen wird, ergeben bei der thermischen Kontraktion nach 5 Minuten bereits 60 % und nach 50 Minuten 80 % K-Gelatine.

Im übrigen ist zu beachten, dass die in der Literatur beschriebenen Versuche über Tropo- und Prokollagen meistens am Material neugeborener Tiere ausgeführt wurden, was offenbar die Voraussetzung für eine nennenswerte Ausbeute ist.[55] Demgegenüber beziehen sich unsere Aussagen über die thermische Kontraktion, abgesehen von der obenerwähnten Vergleichsstudie, auf Material geschlechtsreifer bzw. seniler Tiere.

---

*) Die unter a)-c) gegebenen Vorschriften haben nur orientierenden Charakter. Bedingungen, die zu reproduzierbaren Ergebnissen führen, müssten mit einer Ausführlichkeit beschrieben werden, die den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Beispielsweise sei bloss angedeutet, dass eine zu häufige Wiederholung der Waschoperation der Vorschrift a) in reinem Wasser zu einer ähnlichen Kolloidbildung führt, wie z.B. beim Waschen von $Fe(OH)_3$, oder wie unter c) beschrieben. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Unlöslichkeit solcher Niederschläge an Spuren im Waschwasser gelöster Stoffe (Polysaccharide)[56] gebunden ist.

Wo der Unterschied zwischen den in der Kälte durch Elektrolyte bewirkten und den thermischen Kollagenextrakten nicht schon aus den Mengenunterschieden hervorgeht, kann er, wie z.B. im Falle von Essigsäure-Prokollagen, an Hand der Kolloid-Eigenschaften nachgewiesen werden. Essigsäure-Prokollagen lässt sich zwar, ähnlich wie K-Gelatine, in warmem Wasser lösen und erstarrt wie diese zu einer Gallerte. Im Gegensatz zu K-Gelatine führt aber die Viskosimetrierung verdünnter Lösungen zu reproduzierbaren, nicht zeitlich ansteigenden Viskositäten und die Werte $\frac{\eta sp}{c}$ ($\frac{\text{Spez. Viskosität}}{\text{Konzentration}}$) fallen 3 - 4 mal höher aus. Anderseits ist bei Säure-Prokollagen, trotz der grösseren Viskosität, die Gelierfähigkeit geringer als bei K-Gelatine; die Grenzgelierkonzentration liegt bei 0,7 %; das Fliessen setzt jedoch allmählich ein, so dass die Zahl weniger scharf definiert ist als bei K-Gelatine. Diese Unterschiede sind in Schema 2 dargestellt.

Schema 2 (vergleiche Text Seite 30)

	Menge	Viskosität	Gelierfähigkeit
K-Gelatine 50'	80 %	schlecht definiert niedrig	gut definiert Grenzkonzentration 0,5 %
Essigsäure-Prokollagen	20-30 %	gut definiert hoch	schlecht definiert niedrig Grenzkonzentration 0,7 %

VII. Aminosäureanalysen der Fraktionen

1. Analysenplan

Um die Aufteilung des Kollagens durch die thermische Kontraktion auch nach chemischen Gesichtspunkten beurteilen zu können, haben wir alle anfallenden Fraktionen, die in Schema 1 zusammengestellt sind, auf ihre Aminosäure-Zusammensetzung untersucht. Zu diesem Zweck stand eine Apparatur zur Säulenchromatographie der Aminosäuren mit selbstätiger Kurvenaufzeichnung nach Stein und Moore *) zur Verfügung.

Die Analyse der hochmolekularen Fraktionen, also der Elastoide (A in Schema 1 und Abb. IV) und der Kontraktionsgelatinen (B, C in Schema 1 und Abb. IV) erfolgte nach Hydrolyse unter Standardbedingungen. **) Zur Sicherstellung der interessanten Befunde wurden ganze Reihen von Kontraktionsversuchen an weiterem Tiermaterial wiederholt ausgeführt und die gewonnenen Fraktionen ebenfalls analysiert. Weiter liegen Analysen vor über den Aminosäure-Gehalt des Dialysates der Kontraktionslösung (D in Schema 1 und Abb. X). Wir untersuchten auch den Trockenrückstand des Wassers, mit welchem die Sehnen vor dem Kontraktionsversuch gewaschen wurden. Die Analyse dieses Rückstandes erlaubt Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Interstitialflüssigkeit, allerdings mit dem Vorbehalt, dass durch das Wässern mit destilliertem Wasser auch Zellmaterial oder Fibroblasten aufgeschlossen und miterfasst werden. Vor der Aminosäureanalyse des Waschwasserrückstandes zerlegten wir diesen in eine dialysierbare und nicht dialysierbare Fraktion. Die letztere wurde vor der Analyse hydrolysiert (Abb. XI und XII). Die niedermolekularen Anteile wurden jeweils sowohl vor als auch nach Hydrolyse analysiert.

Im Sinne unserer primär gerontologischen Fragestellung waren alle Analysen konsequent als Doppelversuch angelegt, d.h. jede Untersuchung wurde sowohl an Sehnenmaterial von jungen als auch an solchem von alten Tieren ausgeführt.

In der weiter unten folgenden Einzelbesprechung der Resultate sollen demnach alle Unterschiede, die zwischen "jung" und "alt" aufgetreten sind, hervorgehoben werden.

Vor dieser Besprechung ist lediglich noch ein Hinweis auf unsere Darstellung der analytischen Resultate notwendig.

---

*) im hiesigen Labor von Dr. R. Weber und nach persönlichen Angaben der Autoren gebaut. 57)

**) In 6-n HCl unter O_2-Ausschluss in geschlossenen Ampullen bei $110^{o}C \pm 1^{o}$.

2. Berechnungsweise der Aminosäure-Resultate

Bei der routinemässigen Ausführung unserer Aminosäure-Analysen werden die Resultate primär angegeben als "Anzahl Mikromole pro 10 mg zur Analyse gelangter Trockensubstanz" (= Molzahlen). Um zum Zwecke einer Uebersicht vorerst den Bruttoanteil einer hochmolekularen Fraktion an Protein abzuschätzen, werden die Molzahlen der einzelnen Aminosäuren mit ihren Aminosäurerestgewichten multipliziert und summiert. *) Diese Summe, bezogen auf 100 Gewichtsteile Trockensubstanz, wird in der Abb. V und in der Tabelle 2 als "prozentualer Proteinanteil" bezeichnet.

Zum Vergleich der Mengen einer einzelnen Aminosäure in verschiedenen Fraktionen ist es zweckmässiger, wenn die Aminosäure-Werte nicht auf die Trokkengewichtseinheit der Fraktion bezogen werden, sondern auf gleiche Proteingehalte umgerechnet vorliegen.

Wir wählten jedoch - aus rein technischen Gründen - als Bezugsmass nicht direkt den aus der Summe der Aminosäure-Reste berechneten Schätzungswert für die Proteinmenge, sondern eine andere, dem Proteingehalt ungefähr proportionale Zahl, die man mit weniger Rechenarbeit unmittelbar aus den Resultaten der Säulenchromatographie erhält. Es ist dies die als SN bezeichnete Zahl der Stickstoffgrammatome, die sich ergibt, wenn man die Summe der Molzahlen der sauren und neutralen Aminosäuren **) des gut bestimmbaren Ammoniaks und der je doppelt gezählten Molzahlen der basischen Aminosäuren ***) bildet.

---

*) Bei Glu und Asp wurde willkürlich das Aminosäure-Restgewicht der freien Säuren und nicht der Monoamide eingesetzt.

**) Asp, Glu, Pro, Thr, Ser, Gly, Ala, 1/2Cys, Val, Met, Ileu, Leu, Tyr und Phe. Das Weglassen des Hydroxyprolins ist in dessen Bestimmungsfehler begründet. Verschiedene kleine Peaks im Chromatogramm, deren Identifizierung zum Teil noch aussteht, wurden ebenfalls weggelassen, da ihre nachträgliche Berücksichtigung eine ständige Revision der Bezugszahl bedingen würde.

***) His, Lys, Arg.
Die doppelte Zählung der basischen Aminosäuren soll ihrer grösseren Zahl an N-Atomen Rechnung tragen. Auf die vierfache Zählung des Arginins (die zwar folgerichtig wäre) wurde verzichtet, um den Einfluss der Bestimmungsfehler einer einzelnen Aminosäure auf die SN-Zahl einzuschränken.

Diese Zahl*) hat für 10 mg Trockensubstanz der meisten von uns betrachteten Fraktionen einen von 100 nicht sehr verschiedenen Wert; man erhält also Zahlen von handlicher und von üblichen Prozentangaben nicht sehr abweichender Grösse, wenn man als Aminosäuren-Vergleichswerte definiert

$$\text{Aminosäuren-Vergleichswert} = AV = 100 = \frac{\text{Anzahl Mikromole Aminosäure pro Gewichtseinheit Trockensubstanz}}{\text{SN pro Gewichtseinheit Trockensubstanz.}}$$

Die erhaltenen Resultate sind in den Tabellen des Anhangs vollständig angeführt. Eine übersichtliche und zur Diskussion geeignete Anordnung des sehr umfangreichen Zahlenmaterials ist aber in fast allen Fällen erst durch graphische Darstellung möglich.**)

3. Ergebnisse

a) Bruttoanteil des Proteins

Einen summarischen Vergleich von altem und jungem Kollagen ermöglicht Abb. V. Darin wird nochmals die durch die Kontraktion verursachte Aufteilung des Proteins in Fraktionen und deren auffällige Altersabhängigkeit dargestellt, ähnlich wie in Abb. IV, jedoch nur an Hand zweier typischer Altersstufen, nämlich von 7 und 32 Monaten. Zusätzlich sind noch die Mengenverhältnisse zwischen Protein, nichtproteinischem, hochmolekularem Material und der dialysierbaren bzw. auswaschbaren Substanz eingezeichnet.***)

---

*) nach willkürlich festgelegten, aber stets beibehaltenen Regeln gebildet

**) Diese soll vorerst lediglich die ohne weiteres identifizierbaren Aminosäuren umfassen. Das Auftreten anderer ninhydrin-positiver Substanzen im Säulenchromatogramm soll weiter unten (Seite 72) erörtert werden.

***) Die auswaschbaren bzw. dialysierbaren Anteile werden durch Wägungen der Rückstände bestimmt, die Proteinanteile wie oben (Seite32, Ziffer 1) durch Aufsummieren der Aminosäurereste beschrieben. Wir verzichten auf die Wiedergabe der Restgewichtzahlen für jede einzelne Aminosäure; die zugrundegelegten Molzahlen finden sich in den Tabellen 3a, 3b und 4a wieder. Es handelt sich dabei um die erstmaligen Aminosäureanalysen an allen bei der Kontraktion anfallenden Fraktionen je einer der beiden Altersstufen.

Man erkennt, dass in bezug auf diese Mengenverhältnisse weder die nativen Sehnen noch die Elastoide einen signifikanten Unterschied zwischen jung und alt aufweisen. Der Proteinanteil des Elastoids ist demjenigen der nativen Sehne sehr ähnlich; das Fehlen eines niedermolekularen Teils beim Elastoid ist angesichts der vorangegangenen Behandlung ohne weiteres verständlich. Des weiteren bleibt auch der Proteinanteil der in der Dilatationsphase nach der Kontraktion in Lösung gegangenen "Rohgelatine" im gleichen Rahmen. Lediglich bei der ohnehin sehr unergiebigen Fraktion von K-Gelatine, die von alten Sehnen in der Kontraktionsphase (5') ausgestossen wird, ist der Proteinanteil viel geringer, nämlich bloss 27 % des hochmolekularen.

b) Aminosäurezusammensetzung

Es soll im folgenden über die Aminosäurezusammensetzung der hochmolekularen Fraktionen, die bei einem 50 Minuten dauernden Versuch anfallen, berichtet werden. Entsprechend unserer Fragestellung stellen wir die Aminosäuren-Vergleichswerte (AV) von insgesamt 4 Stoffen einander gegenüber, nämlich:

1. Elastoid junger Tiere (A jung)
2. Gelatine junger Tiere (B + C jung)
3. Elastoid alter Tiere (A alt)
4. Gelatine alter Tiere (B + C alt)

Es liegen zwar, wie erwähnt, auch Analysen vor, in welchen die K-Gelatine der "5-Minutenperiode" (Kontraktion) und der "45-Minutenperiode" (Wiederverlängerung) gesondert analysiert wurden. Diese Analysendaten (Tabelle 3a und 3b) werden hier nicht im einzelnen besprochen, da die Unterschiede der AV-Werte zwischen der nach 5 Minuten und nach 45 Minuten anfallenden K-Gelatine innerhalb der analytischen Fehlergrenze lagen, insbesondere bei der sehr knapp ausgefallenen Fraktion "5-Minutenperiode" alter Tiere, wo das Material für eine genauere Bestimmung nicht ausreichte. In der folgenden Diskussion sind deshalb die Aminosäure-Zusammensetzungen stets für die vereinigte K-Gelatine des ganzen, auch die Wiederverlängerungsphase umfassenden Kontraktionsvorgangs zugrunde gelegt (B + C in Schema 1 und Abb. VI).

Ebenso sehen wir, wenigstens im Rahmen dieser ersten Diskussion, davon ab, die Aminosäure-Analysen an nativen Sehnen detailliert zu besprechen. Reale Unterschiede zwischen den einzelnen Fraktionen treten ohnehin deutlicher durch deren gegenseitigen Vergleich zutage, als wenn die Amino-

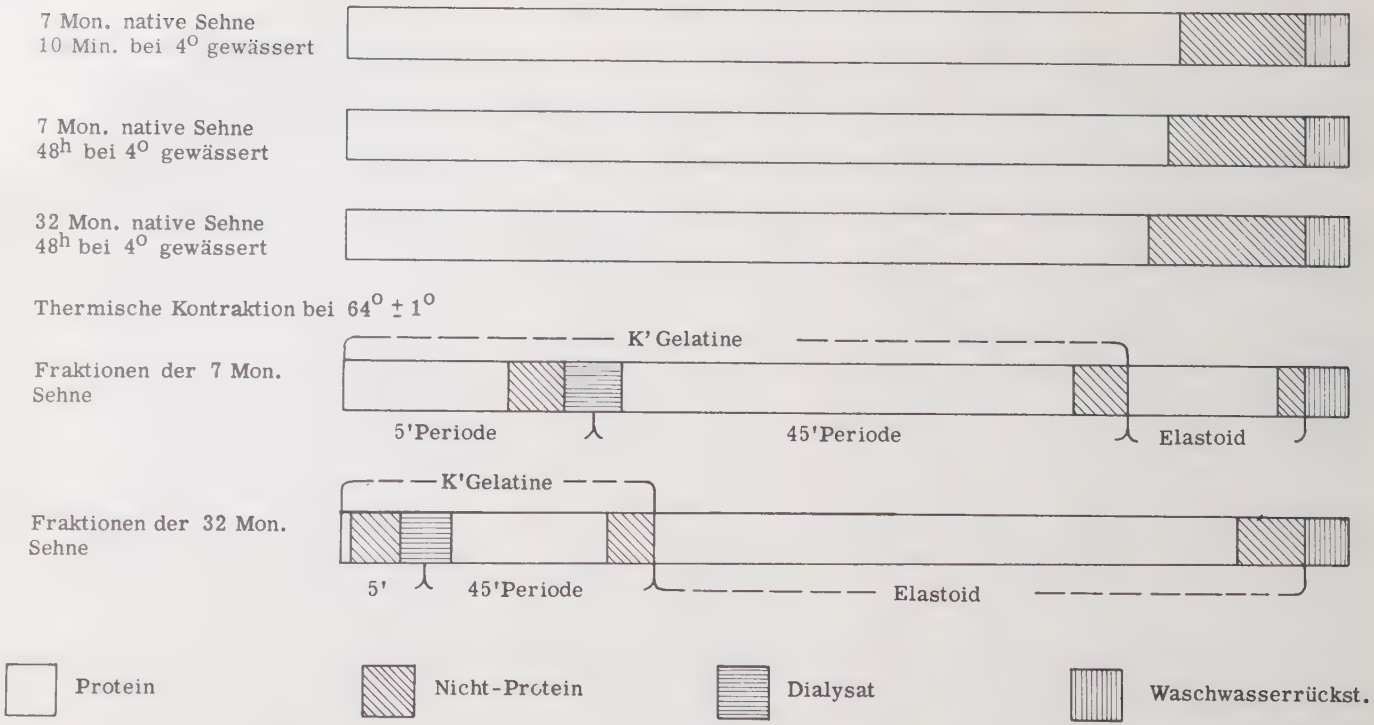


Abb. V "Bruttozusammensetzung" (= prozentualer Anteil an Protein und an auswaschbaren bzw. dialysierbaren Substanzen) nativer Sehnen und der Kontraktionsfraktionen

Legende zu Abb. V und Tabellen 2 und 3

"Bruttozusammensetzung" (= prozentualer Anteil an Protein und an auswaschbren bzw. dialysierbaren Substanzen) nativer Sehnen und der Kontraktionsfraktionen

Bei den 7 Monate alten nativen Sehnen wurden sowohl eine 10 Minuten als auch eine 48 Stunden gewässerte Sehne (reines Wasser) analysiert. Da kein Unterschied in der Aminosäurezusammensetzung festgestellt werden konnte (Tabelle 4), wurde auf eine Analyse der 10 Min. gewässerten 32 Monate alten nativen Sehne verzichtet. Die Aminosäureanalysen der getrennten K-Gelatinen (Perioden zu 5 und 45 Min.) ergaben bei Sehnen junger Tiere keine nennenswerten Unterschiede. Bei der Beurteilung des entsprechenden Zahlenmaterials alter Tiere ist zu berücksichtigen, dass hier sowohl die Gesamtmenge als auch der Proteinanteil der 5-Min.-Periode sehr gering ausfällt. Nach der Umrechnung auf gleiche Proteinmengen sind die AV-Werte dieser Periode mit einem zu grossen Fehler behaftet, um als real angesehen werden zu können (Tabelle 3b).

Die Zahlen dieser Tabellen wurden verwendet:

A : Zur Bestimmung der Bruttozusammensetzung von Sehnen, K-Gelatinen und Elastoid (Abb. V)

B : Zur Berechnung der Aminosäurezusammensetzung der vereinigten (5 und 45 Minuten) K-Gelatinen, wie dies in den Tabellen 5a bis 5d gemacht wurde (für jede Aminosäure durch Addition der beiden Aminosäuremengen mit dem Bruchteil der Fraktionsmengen).

C : Als Hinweis darauf, dass in Zukunft die K-Gelatine der 5'- und 45'-Perioden nicht getrennt zu analysieren sind.

D : Zur Berechnung der Aminosäurezusammensetzung nativer Sehnen (Tabelle 4a)

säure-Menge einer Fraktion mit dem entsprechenden Wert der Sehne (die ja einen Mittelwert aus den Fraktionen repräsentiert) verglichen wird. Wir haben uns aber überzeugt, dass die "analytische Bilanz" in dieser Beziehung stimmte, nämlich, dass die Aminosäure-Zusammensetzung der Sehne, die man aus der Zusammensetzung der Fraktionen und deren Menge errechnet, mit den direkt an Sehnen vorgenommenen Analysen, im Rahmen der Versuchsfehler, übereinstimmt. *)

Da die Vereinigung unserer sämtlichen Analysendaten auf einen repräsentativen Mittelwert für die Aminosäure-Zusammensetzung des Kollagens schliessen lässt, sind diese Werte ebenfalls, und zwar für zwei Altersstufen, in Tabelle 4b dargestellt, sollen aber erst später (vgl. Seite 39) diskutiert werden.

In Abb. VI sind die AV-Werte in Blöcken zusammengestellt, jeder Block A bzw. B bezieht sich auf das Elastoid bzw. die K-Gelatine junger Tiere, jeder Block C bzw. D auf das Elastoid bzw. die K-Gelatine alter Tiere. Das zu besprechende Zahlenmaterial ist das Ergebnis dreier getrennter Versuchsserien. Die beiden äusseren Kolonnen jedes Blocks entsprechen jeweils dem Aminosäuregehalt des Materials eines einzelnen Tieres. Die mittlere Säule basiert überall auf Analysen, bei welchen die betreffende Fraktion aus je 5 Tieren gewonnen und vereinigt wurde.

Eine erste Betrachtung der Abb. VI (und Tab. 5a-5d) vermittelt den Eindruck, dass mindestens die Grössenordnungen der einzelnen AV-Werte in den verschiedenen Fraktionen und Altersklassen recht ähnlich und deshalb auch von den AV-Werten beim nativen Kollagen nur wenig verschieden sind.

---

*) Einzig beim Histidin besteht eine noch unabgeklärte Diskrepanz in dem Sinne, dass die Bilanz aus den Werten aller Zerfallsfraktionen einer Sehne zu einem deutlich niedrigeren Wert führt, als die direkte Analyse einer gleich vorbehandelten nativen Sehne. Es ist nicht ausgeschlossen, dass das an der nativen Sehne gefundene Analysenresultat durch Ueberlagerung mit einer unbekannten Substanz verfälscht wurde, die aus irgend einem Grunde in den Fraktionen verloren ging.

Dennoch sind gewisse typische Unterschiede unverkennbar. Zur Beurteilung von deren Signifikanz*) soll vor allem die visuell erkennbare Uebereinstimmung der drei völlig unabhängigen, durch die drei Blockteile dargestellten Bestimmungen herangezogen werden. Es ist dabei zu bedenken, dass sich die Unterschiede zwischen den Säulenteilen aus der biologischen Streuung, allfälligen Fehlern bei der Aufbereitung und bei der Hydrolyse schliesslich aus dem Bestimmungsfehler der Aminosäure-Analyse zusammensetzen. Man erkennt, dass die Aminosäuren, für welche sich zwischen den Fraktionen eigentlich signifikante Unterschiede ergeben, gruppenweise zusammenfallen. Die Aminosäuren Val, Ileu und Tyr, nicht ganz so deutlich auch Asp, Thr und Phe, besonders deutlich (vgl. Abb. VII und weiter unten im Text) aber Cys, zeigen typische und gleichsinnige Unterschiede von Fraktion zu Fraktion. Diese Aminosäuren sind nämlich bei den jungen Tieren im Elastoid in grösserer Menge vorhanden als in der zugehörigen Kontraktionsgelatine. Für die alten Tiere gilt grundsätzlich das gleiche, nur ist der erwähnte Unterschied bei allen der 8 betrachteten Aminosäuren kleiner als bei jungen Tieren.

Somit unterscheidet sich also das Elastoid von der Gelatine auch chemisch durch einen deutlich grösseren Gehalt an diesen 8 Aminosäuren, von denen vier, nämlich Val, Leu, Ileu und Phe, sich durch das Merkmal eines grossen Kohlenwasserstoffgehaltes, also durch lipophilere Eigenschaften, zusammenfassen lassen. Dabei ist, wie erwähnt, deren Ueberwiegen im Elastoid alter Tiere etwas weniger ausgeprägt. Die Auswirkung der verschiedenen Aminosäurezusammensetzung von jungem und altem Elastoid einer-

*) Soweit diese Unterschiede in der Besprechung als nennenswert erwähnt sind, halten sie einem Signifikanztest mit den üblichen einfachen Methoden (t-Test) stand. Hierbei behandeln wir den Wert aus gepooltem Material - nicht ganz korrekt, aber im Sinne einer zu strengen Beurteilung - als Einzelwert. Eine eingehende statistische Untersuchung (die auch dem gruppenweisen Auftreten von Unterschieden Rechnung tragen müsste), wäre mit beträchtlichem Aufwand verbunden. Wir halten in unserem Falle den visuellen Vergleich der figürlich dargestellten Einzelwerte für den rationelleren Weg, um zu einem umfassenden Urteil zu gelangen. Die durch den Analysenfehler bedingte Standardabweichung der AV-Werte macht in den meisten Fällen 2 - 3 % des angegebenen Betrages aus. Sie kann in einzelnen Fällen auch grösser sein, z.B. beim Histidin, dessen Bestimmung durch unbekannte Fremdsubstanzen gestört wurde. Beim Pro bedingt die kleine Farbausbeute der Ninhydrin-Reaktion einen Fehler von 5 - 6 %, beim Gly ist die hohe Menge für einen Bestimmungsfehler von 4 - 5 % verantwortlich. Beim Thr und Ser ist überdies zu beachten, dass die angegebenen Werte wegen der Zerstörung durch Hydrolyse etwas zu tief liegen (Fehler 6% beim Thr, ca. 10% beim Ser).

Legende zu Abb. VI

Aminosäurevergleichswerte von Elastoid und K-Gelatine junger und alter Tiere

Aminosäurevergleichswerte AV, d.h. auf einen SN-Wert (Definition siehe Seite 34) von 100 bezogene Anzahl Mole Aminosäure für hydrolysiertes Elastoid und K-Gelatine je zweier Altersgruppen (7 bzw. 25-32 Monate), bezeichnet als

A = Elastoid jung
B = K-Gelatine jung
C = Elastoid alt
D = K-Gelatine alt

Die biologische und analytische Streuung wird unmittelbar dargestellt, indem in je einem Block der Abb. VI die erste und die letzte der drei aneinandergereihten Säulen den Fraktionen aus Sehnen je eines einzelnen Tieres entsprechen, die mittlere den vereinigten gleichartigen Fraktionen aus Sehnen von 5 Tieren.

Der Massstab und der Nullpunkt der AV-Werte ist in Abb. VI überall derselbe, mit Ausnahme des Gly, bei dem der grossen Werte wegen die Zählung - im gleichen Massstab - bei 25 beginnt.

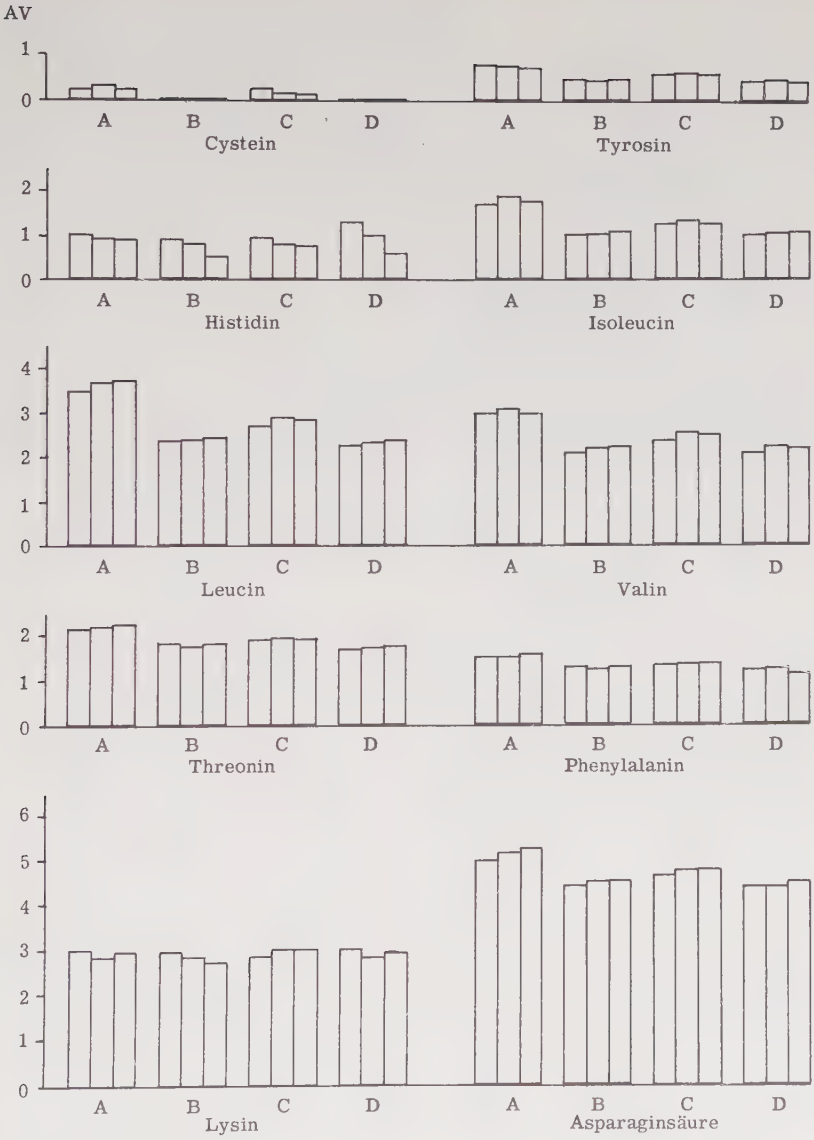


Abb. VI Graphische Darstellung der Aminosäure-Zusammensetzung von Elastoid und K'Gelatine

A = Elastoid junger Tiere
B = K'Gelatine junger Tiere
C = Elastoid alter Tiere
D = K'Gelatine alter Tiere

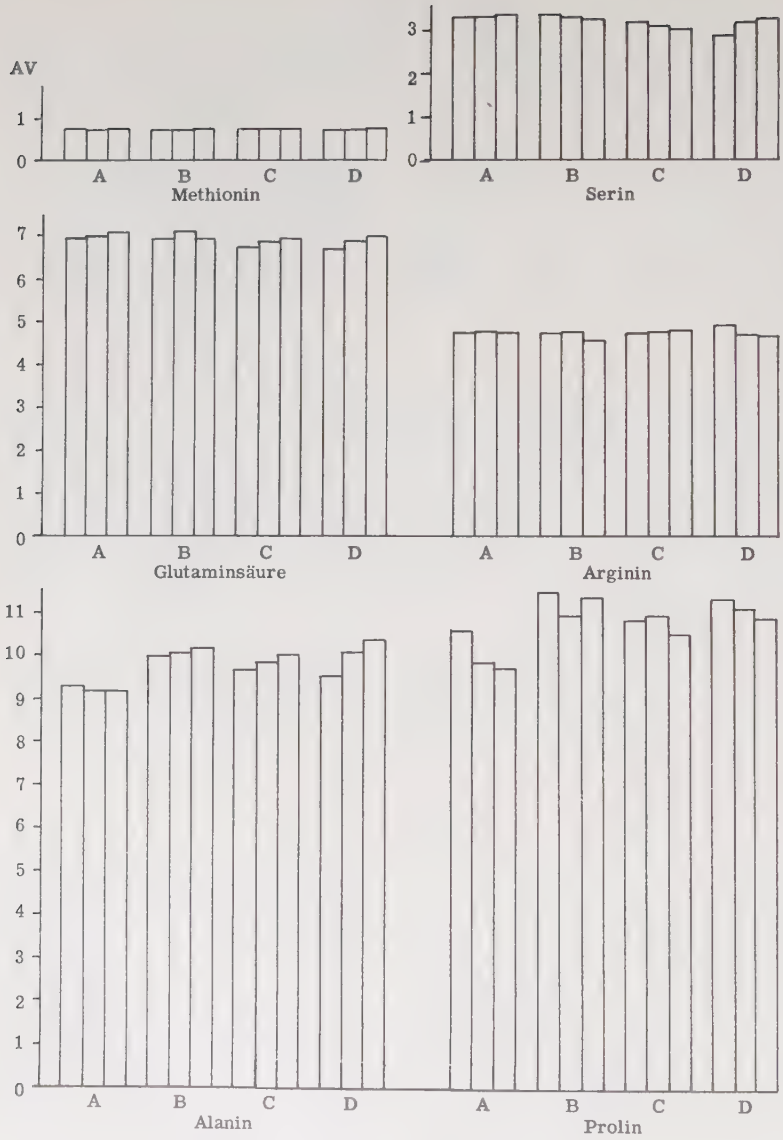


Abb. VI (Fortsetzung)

A = Elastoid junger Tiere
B = K'Gelatine junger Tiere
C = Elastoid alter Tiere
D = K'Gelatine alter Tiere

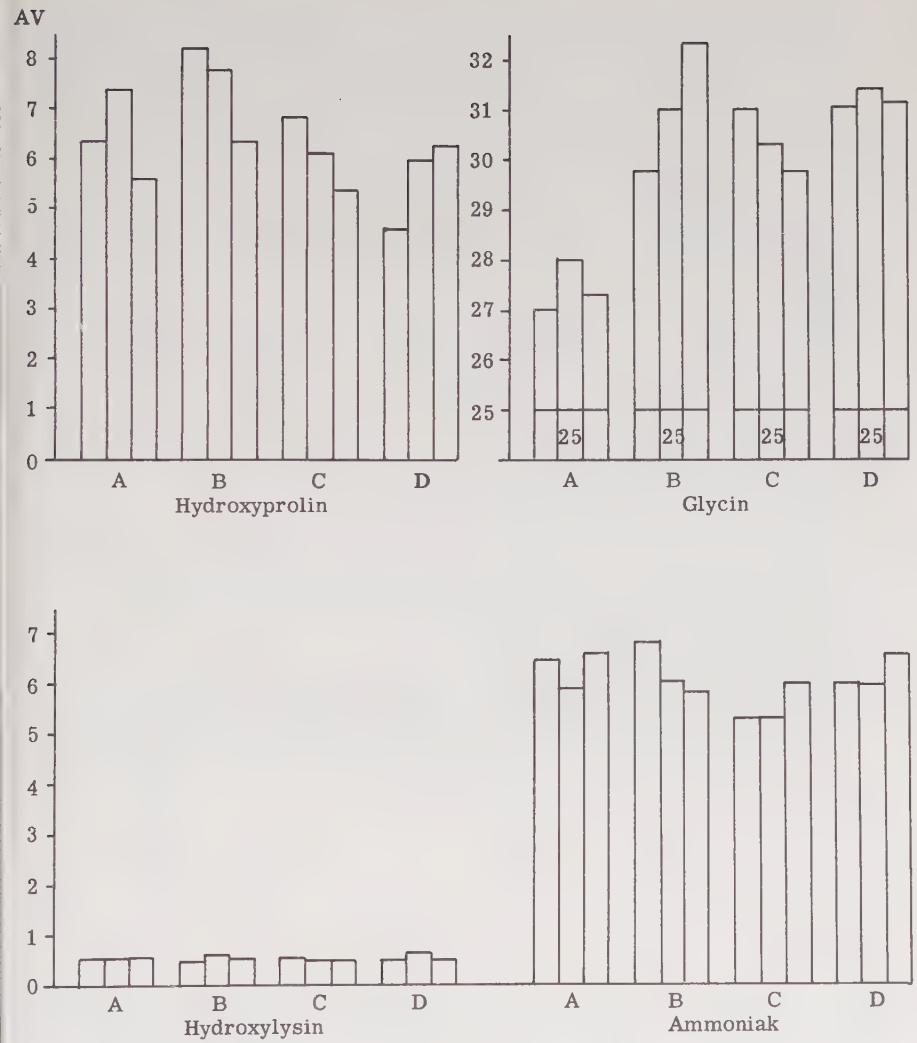


Abb. VI (Fortsetzung)

A = Elastoid junger Tiere
B = K'Gelatine junger Tiere
C = Elastoid alter Tiere
D = K'Gelatine alter Tiere

(50 Periode)

seits und dessen verschiedener Menge andererseits auf die Aminosäurezusammensetzung jungen bzw. alten Kollagens können sich also gerade aufheben. In der Tat finden wir beim Vergleich von altem und jungem Kollagen in bezug auf die erwähnten Aminosäuren nur noch kleinste Unterschiede (im Sinne der Vermehrung einiger Aminosäuren der lipophilen Gruppe im Alter), deren Signifikanz keineswegs gesichert ist (Tab. 5a-5b).

Die ausgeprägtesten Unterschiede von Fraktion zu Fraktion fanden wir im Cysteingehalt*) er ist im Elastoid bedeutend grösser als in der Kontraktionsgelatine.

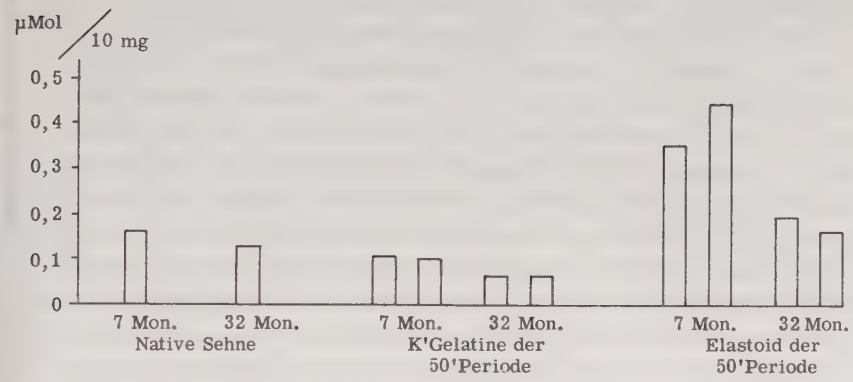
Die Cysteinsäure-Werte sind in Abb. VII dargestellt, in einem gegenüber Abb. VI zehnfach vergrösserten Massstab. Man erkennt, dass das Elastoid in jedem Fall viel mehr Cystein enthält als die K-Gelatine; der Unterschied ist bei jungen Tieren sehr ausgeprägt, nämlich 0,4 µMol im Elastoid und 0,1 µMol in der K-Gelatine. Bei alten Tieren ist das Verhältnis 0,2 µMol im Elastoid und 0,1 µMol in der K-Gelatine (Tab. 7).

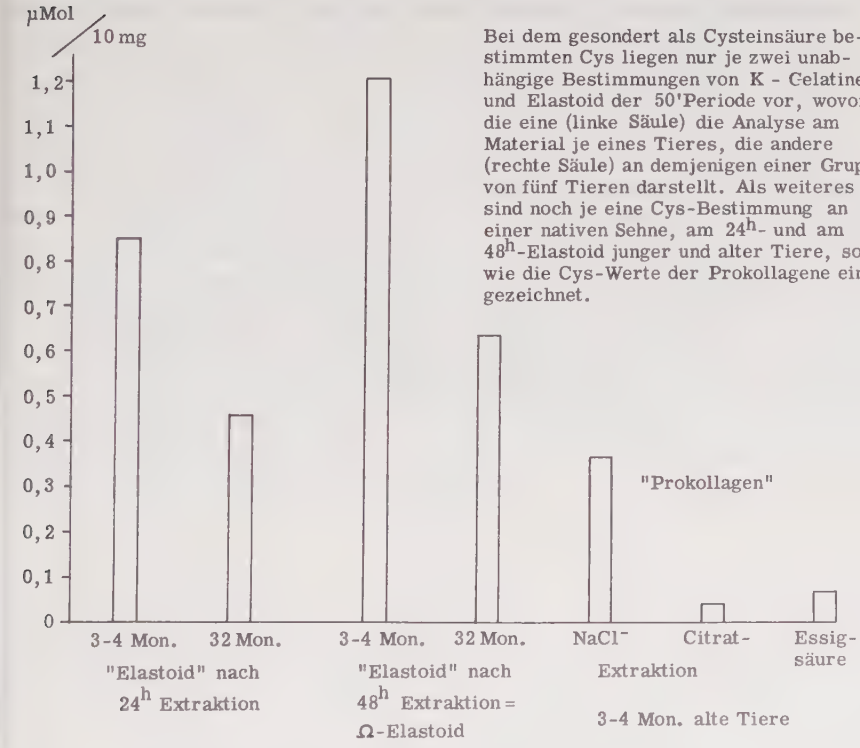
Beim Vergleich der Cysteinsäure-Werte im Gesamtkollagen ergeben sich wiederum beträchtliche Unterschiede. Merkwürdigerweise scheinen alte Sehnen sogar weniger (0,14 ± 0,01) Cystein als junge (0,16 ± 0,01) zu enthalten. Ein t-Test ergibt gerade ein P von 0,05. Wir dürfen den Unterschied deshalb nicht als signifikant bezeichnen.

Wir finden also bei der Gegenüberstellung Elastoid/K-Gelatine sowie jung/alt Verhältnisse, wie sie bei den lipophilen Aminosäuren aufgetreten sind, allerdings mit viel ausgeprägterem Ueberwiegen des Cysteins im Elastoid.

---

*) Der Unterschied trat zwar schon im Chromatogramm der sauerstofffrei hydrolysierten Fraktionen zutage. Genauere Cysteinzahlen vermittelt aber erst eine separate Analyse, bei welcher die Fraktion vor der Hydrolyse mit Perameisensäure oxydiert und das Cystin als Cysteinsäure bestimmt wird. Der Genauigkeitsgrad dieser Art von Cys-Bestimmung ist vorerst nicht sicher angebbar, weil zum säulenchromatographischen Bestimmungsfehler, der auf 3 - 5 % des Wertes geschätzt werden kann, die durch die oxydative Aufschlussmethode bedingte Streuung hinzutritt und reine Reproduzierbarkeitsteste nicht gemacht wurden. Jedoch geben wiederum Analysen, die an analogen Fraktionen aus verschiedenen Tierexemplaren der gleichen Altersklassen ausgeführt wurden, Aufschluss über den gesamten, die analytische und biologische Streuung umfassenden Fehler.





Bei dem gesondert als Cysteinsäure bestimmten Cys liegen nur je zwei unabhängige Bestimmungen von K - Gelatine und Elastoid der 50'Periode vor, wovon die eine (linke Säule) die Analyse am Material je eines Tieres, die andere (rechte Säule) an demjenigen einer Gruppe von fünf Tieren darstellt. Als weiteres sind noch je eine Cys-Bestimmung an einer nativen Sehne, am 24^h- und am 48^h-Elastoid junger und alter Tiere, sowie die Cys-Werte der Prokollagene eingezeichnet.

Abb. VII Bestimmung von Cystein als Cysteinsäure

(In Abb. VII ist der Masstab für die AV-Werte 10 mal grösser gewählt worden, als in den übrigen graphischen Darstellungen).

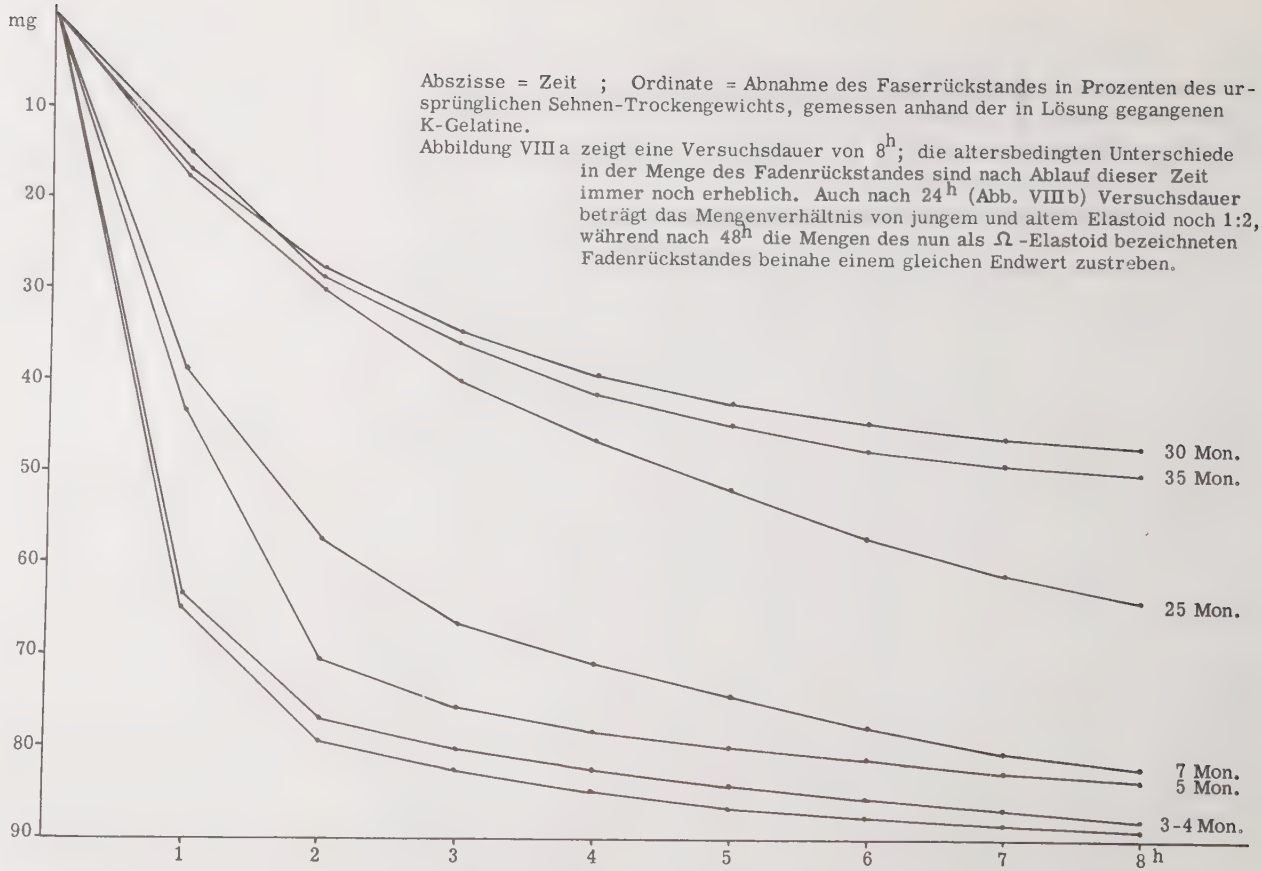
c) Folgerung aus der Aminosäurezusammensetzung des Elastoids

K-Gelatine aus Sehnen alter Tiere unterscheidet sich in der Aminosäure-Zusammensetzung kaum von derjenigen junger Tiere. Hingegen besteht, wie erwähnt, zwischen Elastoiden verschiedener Altersklassen ein Unterschied in dem Sinne, dass das Elastoid alter Tiere der K-Gelatine ähnlicher zusammengesetzt ist. Da zugleich auch in einem Kontraktionsversuch von 50 Minuten an älteren Sehnen mehr Elastoid zurückbleibt, ist zu vermuten, dass dieser Rückstand noch keine Einheit darstellt, sondern dass noch ein gelatineartiger Anteil vorhanden ist, der mit grosser Beharrlichkeit zurückgehalten wird. Es lag deshalb nahe, in einer weiteren Versuchsserie den Austritt löslicher Substanz in das Badwasser während einer längeren Zeitdauer zu verfolgen. Da sich diese Versuche erst auf Grund der Aminosäure-Befunde als notwendig erwiesen, fügen wir deren Beschreibung an dieser Stelle ein.

VIII. Verlängerte Extraktion des Elastoides = Ω - Elastoid

1. Ausführung der Versuche

Die Abgabe weiterer löslicher Substanz aus dem redilatierten Elastoid in die Badflüssigkeit lässt sich quantitativ verfolgen, indem diese in zweckmässigen zeitlichen Abständen abgesaugt, durch frisches Wasser ersetzt und untersucht wird. Die eingeengten Badflüssigkeiten hatten bis zum Ende der 48 stündigen Versuche die Konsistenz einer Gelatine. Wir verzichteten jedoch sowohl auf eine kolloidchemische Kennzeichnung als auch auf die Feststellung eines dialysierbaren Teils und bestimmten lediglich das genaue Trockengewicht. Die zeitliche Abnahme des Trokkengewichts des so fortgesetzt extrahierten Elastoids, verfolgt an Hand der gesammelten Extraktgewichte, ist in Abb. VIIIa und b dargestellt. Der Kurvenabfall stellt die Geschwindigkeit des Austritts löslichen Materials in das umgebende Wasser dar. Man erkennt insbesondere aus Abb. VIIIa bei den 8-stündigen Versuchen, dass die Austrittsgeschwindigkeit in den ersten Stunden umso grösser ist, je jünger die Tiere sind, um bei verlängerter Versuchsdauer wieder abzuklingen. Nach einer Versuchsdauer von 48^h (Abb. VIIIb) bleibt ein Elastoid-Faden, dessen Menge 6 - 15 % des ursprünglichen Sehnentrockengewichts beträgt. Die Mengen der Faserrückstände nach dieser langdauernden Extraktion sind bedeutend weniger vom Tieralter abhängig als die Mengen gewöhnlichen (50-Minuten) Elastoids. Man gewinnt also aus den Kurven den Eindruck, als ob eine Sehne, ungeachtet des Alters, zusammengesetzt sei aus etwa 8 % einer besonders unlöslichen Komponente, die wir als Ω-Elastoid bezeichnen, und einem als K-Gelatine extrahierbaren Material. Der Austritt der K-Gelatine im Wasserbad von 65^o erfolgt mit einer ungefähr wie eine Reaktion erster Ordnung abnehmenden Geschwindigkeit, deren Abklingungskonstante bei jungen Tieren bedeutend grösser ist als bei alten.



Abszisse = Zeit ; Ordinate = Abnahme des Faserrückstandes in Prozenten des ursprünglichen Sehnen-Trockengewichts, gemessen anhand der in Lösung gegangenen K-Gelatine.

Abbildung VIII a zeigt eine Versuchsdauer von 8^h; die altersbedingten Unterschiede in der Menge des Fadenrückstandes sind nach Ablauf dieser Zeit immer noch erheblich. Auch nach 24^h (Abb. VIII b) Versuchsdauer beträgt das Mengenverhältnis von jungem und altem Elastoid noch 1:2, während nach 48^h die Mengen des nun als Ω -Elastoid bezeichneten Fadenrückstandes beinahe einem gleichen Endwert zustreben.

Abb. VIIIa K'Gelatinabgabe bei verlängerter Versuchsdauer (Total 8^h) bei 65^o in dest. H_2O

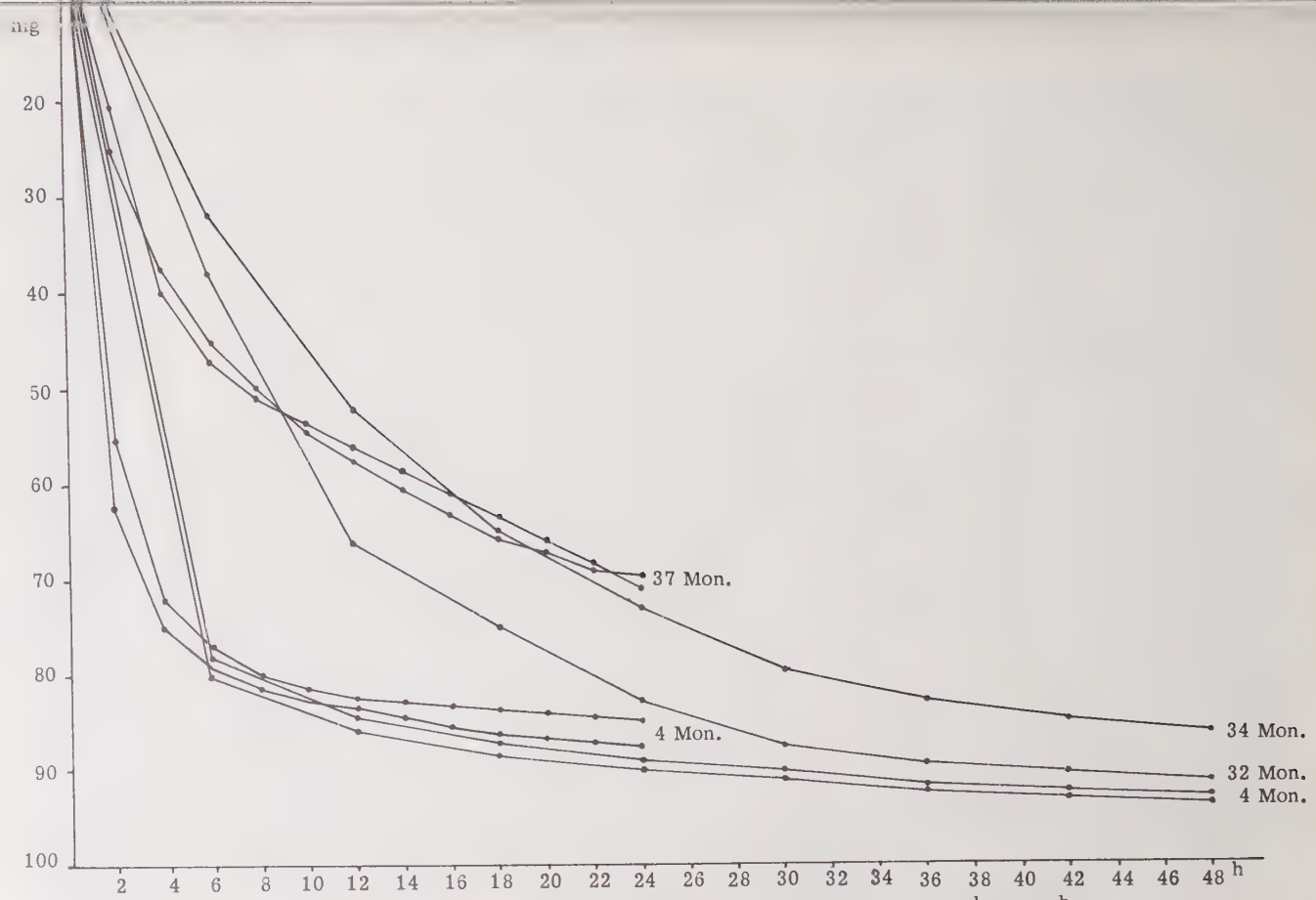


Abb. VIIIb K'Gelatinabgabe bei verlängerter Versuchsdauer (Total 24^h und 48^h)

(Text siehe Abb. VIII a)

2. Aminosäurezusammensetzung der Ω-Elastoide

Die Resultate der Aminosäureanalysen von Ω-Elastoid sind in Tabelle 8a, 8b und 8c (sowie Abb. IX) dargestellt. Man erkennt sofort, dass die für das Elastoid typische Vermehrung der acht bereits erwähnten Aminosäuren Asp, Leu, Thr, Val, Ileu, Tyr, Phe und Cys gegenüber der K-Gelatine beim Ω-Elastoid (48^h Extraktionsversuch) noch viel ausgeprägter ist. Beispielsweise beträgt der AV-Wert von Leu junger K-Gelatine 2,5, 50-Minuten-Elastoid 3,7, 24^h-Elastoid 4,4, Ω-Elastoid 5,7. Bei alten Tieren ist der gleiche Gang festzustellen, nur ist hier die Vermehrung im Elastoid nicht so stark ausgeprägt (K-Gelatine 2,3, 50-Minuten-Elstoid 2,9, 24^h-Elastoid 3,8 und Ω-Elastoide 4,4).

Umgekehrt nehmen in der Reihe K-Gelatine - Elastoid - Ω-Elastoid die Aminosäuren Gly, Pro und Hypro derart ab, dass schliesslich Ω-Elastoid*) eine Zusammensetzung aufweist, die von der typischen Kollagenzusammensetzung wesentlich abweicht.

Die Aminosäurezusammensetzung vom stufenweise durch thermische Kontraktion und Nachextraktion fraktionierten Kollagen lässt nun, wenn man gleichzeitig die erhaltenen Extrakt- und Rückstandmengen in Betracht zieht, Schlüsse auf allfällige Uneinheitlichkeit der austretenden K-Gelatine zu. Bestünde nämlich Kollagen aus zwei einheitlichen Komponenten, Ω-Elastoid und K-Gelatine, und wäre demnach das 50-Minuten-Elastoid ein Stoff, der aus Ω-Elastoid und entsprechend weniger, aber immer gleich zusammengesetzter K-Gelatine ist, so müsste dies in einer einfachen Proportionalität aller Aminosäuregehalte der Zwischenprodukte zum Ausdruck kommen. Ueberdies müsste sich die Aminosäurezusammensetzung von beispielsweise Kollagen oder 50-Minuten-Elastoid aus den Gewichtsbilanzen der Fraktionen und der Zusammensetzung von K-Gelatine und Ω-Elastoid berechnen lassen. In Wirklichkeit treten aber in einigen Fällen signifikante Abweichungen vom Bild eines Gemisches zweier einfacher Komponenten auf.

Ein Weg, wie Näheres über den Unterschied in der Zusammensetzung von K-Gelatine der 50-Minuten-Periode (im folgenden Text "Primär-Gelatine" genannt) und der später austretenden K-Gelatine ("Sekundär-Gelatine") erfahren werden kann, ist in der Legende zu Abb. VIIIc beschrieben. Betrachtet man diese Abbildung und vergegenwärtigt sich die Regel, die schliesslich aus den Ueberlegungen der Legende folgt, so gelangt man zu folgendem Bild:

---

*) Vergleiche mit der Aminosäurezusammensetzung von Elastin junger und alter Tiere (Ligamentum nuchae, 3 Wochen altes Kalb und 14 jährige Kuh) haben gezeigt, dass das Elastoid mit dem Elastin nicht identisch sein kann (Abb. XIV, Tab. 13).

a) Junges Sehnenmaterial

Für ungefähr die Hälfte der analysierten Aminosäuren besteht kein signifikanter Unterschied zwischen primärer und sekundärer K-Gelatine; bei Gly, Ala, Lys, Ser, evtl. Pro, Hypro und Tyr gewinnt man aber den Eindruck, dass sekundäre Gelatine eine Zusammensetzung aufweist, die im Sinne des Falles 3 der Legende vom Ω-Elastoid noch mehr abweicht als primäre K-Gelatine.

b) Altes Sehnenmaterial

Beim alten Kollagen sind wiederum etwa für die Hälfte der Aminosäuren, jedoch für eine andere Gruppe als bei den jungen Tieren, keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Bei den Aminosäuren Leu, Val, Thr, Phe, Tyr, Ileu, Lys und, abgesehen von einem einzelnen Wert, auch bei Asp (also bei den Vertretern der schon oft genannten, im Elastoid vermehrten Gruppe), liegt Y links von den El 50-Fusspunkten. Die sekundäre K-Gelatine ist also elastoidähnlicher. Dieser Befund lässt sich nun zwanglos in Zusammenhang bringen mit zwei anderen Eigentümlichkeiten alter Sehnen, nämlich dem langsamen Austritt von K-Gelatine und der nicht so stark von der K-Gelatine junger Sehnen abweichenden Aminosäure-Zusammensetzung des Ω-Elastoids. Ueber den Aufbau von altem Kollagen ergäbe sich dann folgende Vorstellung: Altes Kollagen besteht, ähnlich wie junges, aus den Komponenten K-Gelatine und Elastoid. Diese Komponenten haben sich aber mit dem Alter in zunehmendem Masse ineinander "verflochten", "verfilzt" oder "vernetzt"*), wobei die an Ω-Elastoid reicheren Partien zugleich die Zentren stärkeren Zusammenhalts sind. Durch dieses Bild würden drei Fakten verständlich:

1. Bei altem Sehnenkollagen löst sich ganz allgemein K-Gelatine viel langsamer aus dem Verband als beim Material junger Tiere.
2. Beim Austritt findet eine kontinuierliche Fraktionierung statt, in dem Sinne, dass sich leicht und rasch die Partien reinerer K-Gelatine herauslösen, weniger leicht und entsprechend langsamer die fester mit dem Elastoid verflochtenen, und dass deshalb die K-Gelatine immer mehr an Ω-Elastoid aus dem Verband mitreisst und somit analytisch Ω-elastoidähnlicher wird. Vollständig kann jedoch die K-Gelatine nie austreten, weil Reste von ihr ziemlich fest mit der Elastoid-"Unterlage" verknüpft sind.

---

*) Man findet die Ansicht, dass das Altern tierischen Gewebes, speziell des Kollagens, mit einer Vernetzung ("cross linking") einhergeht, derart häufig in zusammenfassenden Arbeiten geäussert, dass der Eindruck entsteht, es handle sich hier um ein längst bewiesenes Faktum. In Wirklichkeit beruht diese Auffassung mehr auf zwar plausiblen Vermutungen, die z.B. durch die abnehmende Löslichkeitstendenz des Kollagens mit dem Alter begründet werden. Chemische Untersuchungen, die fast zwingend auf ein cross linking in altem Gewebe schliessen lassen, sind deshalb geeignet, eine bisher bestehende Lücke auszufüllen.

So leuchtet auch die Tatsache

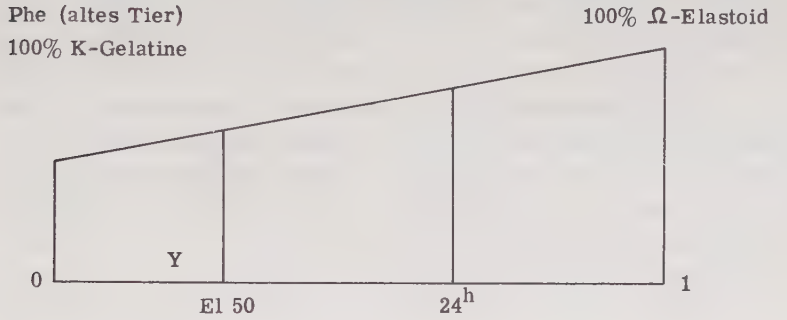
3. ein, dass auch die analytische Zusammensetzung von Ω-Elastoid alter Tiere weniger von der K-Gelatine-Zusammensetzung abweicht als diejenige junger Tiere.

Damit ist die Beschreibung des Tatsachenmaterials vollständig, --- soweit es in der Diskussion zu einem geschlossenen Bild über den Feinbau von jungem und altem Kollagen verarbeitet werden soll. Die nachfolgenden, kurz beschriebenen Analysen an "Nebenfraktionen" und an Tropo- und Prokollagen und Elastin sind mehr der Vollständigkeit halber angeführt.

Legende zu Abb. VIIIc

Kombinierte Darstellung der Mengenverhältnisse der Fraktionen nach Kontraktion und verlängerter Extraktion sowie der Aminosäurezusammensetzungen

Aufbau der Abbildung, dargestellt am Beispiel des Phenylalanins:



Am linken Ende der Abszisse (100% K-Gelatine) ist der Gehalt der K-Gelatine der ins Auge gefassten Aminosäure (Phe) als Ordinate aufgetragen, am rechten Ende (100% Ω-Elastoid) derjenige des Ω-Elastoids. Die beiden Ordinaten sind durch eine Gerade miteinander verbunden. Jedem Punkt (P) auf der Abszissenachse entspricht also ein aus P% reiner K-Gelatine und 100-P% reinem Ω-Elastoid zusammengesetztes Gemisch. Dem Verhältnis $\frac{P}{100-P}$ entspricht das Mengenverhältnis Ω-Elastoid zu K-Gelatine. Der Aminosäuregehalt dieses theoretischen Gemisches - immer unter der Voraussetzung, dass K-Gelatine und Ω-Elastoid einheitliche Stoffe sind - lässt sich als Ordinatenabschnitt an der schrägen Verbindungslinie ablesen.

Anhand der Figur können dann die realen Verhältnisse auf Grund der Abweichung von der theoretischen Voraussage diskutiert werden. Die Lage der Marke Y wurde berechnet aus den Wägeresultaten der Kontraktions- und Extraktionsversuche, nach Abb. IV und VIIIa und b. Die Marke Y teilt die Abszisse im Verhältnis

$$\frac{\text{50-Min-Elastoid minus Gewichtsverlust}}{\text{Gewichtsverlust}}$$

Anderseits wurde der analytisch bestimmte Phe-Gehalt des 50-Min-Elastoids als Ordinate genommen und derjenige Punkt auf der Abszisse markiert, an dem diese Ordinate (mit El 50 bezeichnet) die schräge Verbindungslinie trifft.

Wenn also der Fusspunkt El 50 und die Marke Y nicht (im Rahmen der Versuchsfehler selbstverständlich) zusammenfallen, so bedeutet dies, dass die oben aufgestellte Hypothese, Elastoid sei aus zwei einheitlichen Komponenten zusammengesetzt, nicht zutrifft: die "sekundäre" K-Gelatine, die nach der 50'-Kontraktion-Dilatation bei verlängerter Extraktion aus dem Elastoid austritt, muss hinsichtlich dieser Aminosäurezusammensetzung anders zusammengesetzt sein als die "primäre" Gelatine. *)

Im betrachteten Fall liegen die den verschiedenen Einzelwerten entsprechenden Fusspunkte El 50 rechts von der Marke Y, weil das Elastoid mehr Phe enthält als das der Marke Y entsprechende Gemisch. Dies kann auf Grund einer leicht zu machenden Ueberlegung nur davon herrühren, dass die sekundäre, in der Nachextraktion austretende K-Gelatine reicher an Phe ist als die primäre, d.h. während der ersten 50'-Periode austretende K-Gelatine. Allgemein sind, je nach der relativen Lage von Y und El 50 und der Neigung der Endordinaten, folgende Fälle möglich:

Schema 3

	El 50 steht links	Von Y rechts
Die Verbindungsgerade der Endordinate ist:	Die sekundäre K-Gelatine enthält :	
steigend	weniger	mehr
fallend	mehr	weniger

der betr. A.S. als primäre K-Gelatine

Die Bedeutung der relativen Lage von Y und El 50 lässt sich auch wie folgt interpretieren:

*) Selbstverständlich wäre dies auf Grund einer direkten Analyse der sekundären K-Gelatine leichter einzusehen. Dem experimentellen Aufwand sind aber Grenzen gesetzt, und wir halten es für gerechtfertigt, das vorhandene Material vollständig zu interpretieren, auf die Gefahr hin, dass die Schlussfolgerung auf komplizierten, aber immerhin zwingenden Ueberlegungen beruht.

Fall 1 : Y liegt links und signifikant ausserhalb der verschiedenen (Streuung!) El 50 Fusspunkte:
Sekundär tritt eine K-Gelatine aus, die in der Zusammensetzung, in bezug auf die ins Auge gefasste Aminosäure, näher beim Elastoid steht.

Fall 2 : Die Verschiedenheit der Lage von Y und El 50 ist nicht signifikant:
Primäre und sekundäre K-Gelatine sind, im Rahmen der Versuchsfehler, gleich zusammengesetzt.

Fall 3 : Y liegt rechts und signifikant ausserhalb der El 50 Fusspunkte:
Die sekundäre K-Gelatine hat eine Zusammensetzung, die noch mehr vom Ω -Elastoid abweicht als primäre K-Gelatine (immer in bezug auf die betrachteten Aminosäuren).

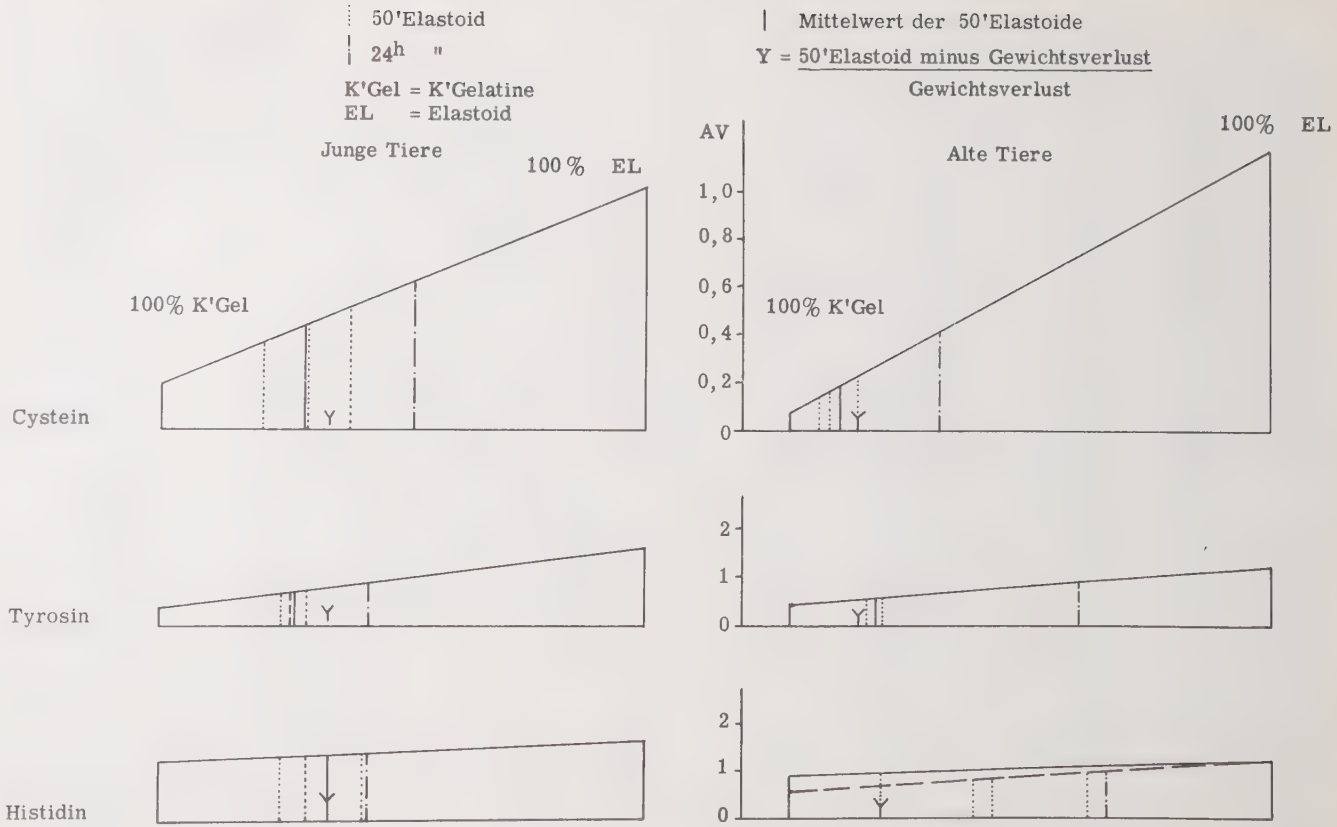


Abb. VIII c_1 Siehe vorstehende Legende

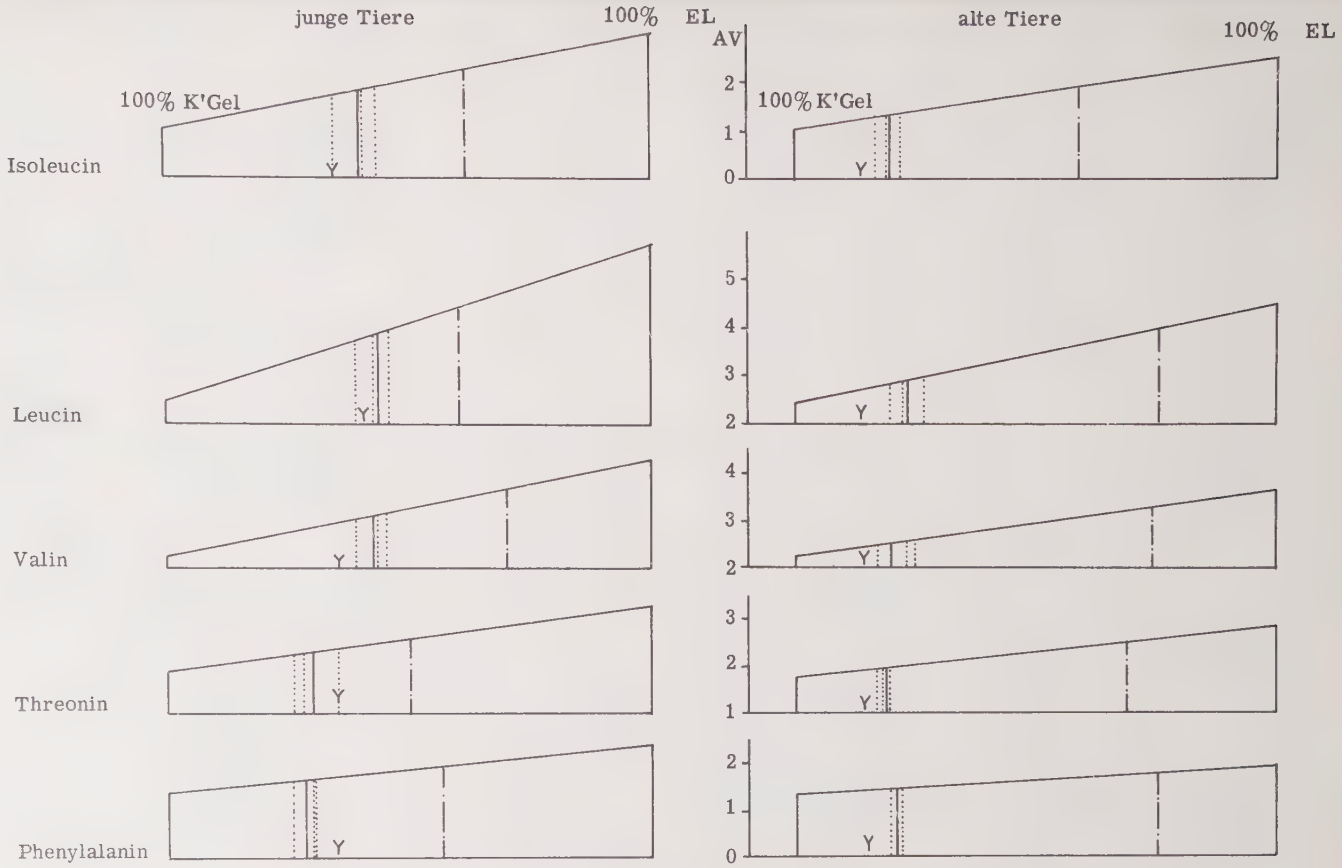

junge Tiere
100% EL
alte Tiere
100% EL
AV
100% K'Gel
100% K'Gel
Isoleucin
Leucin
Valin
Threonin
Phenylalanin
Y
0
1
2
3
4
5

Abb. VIII c2

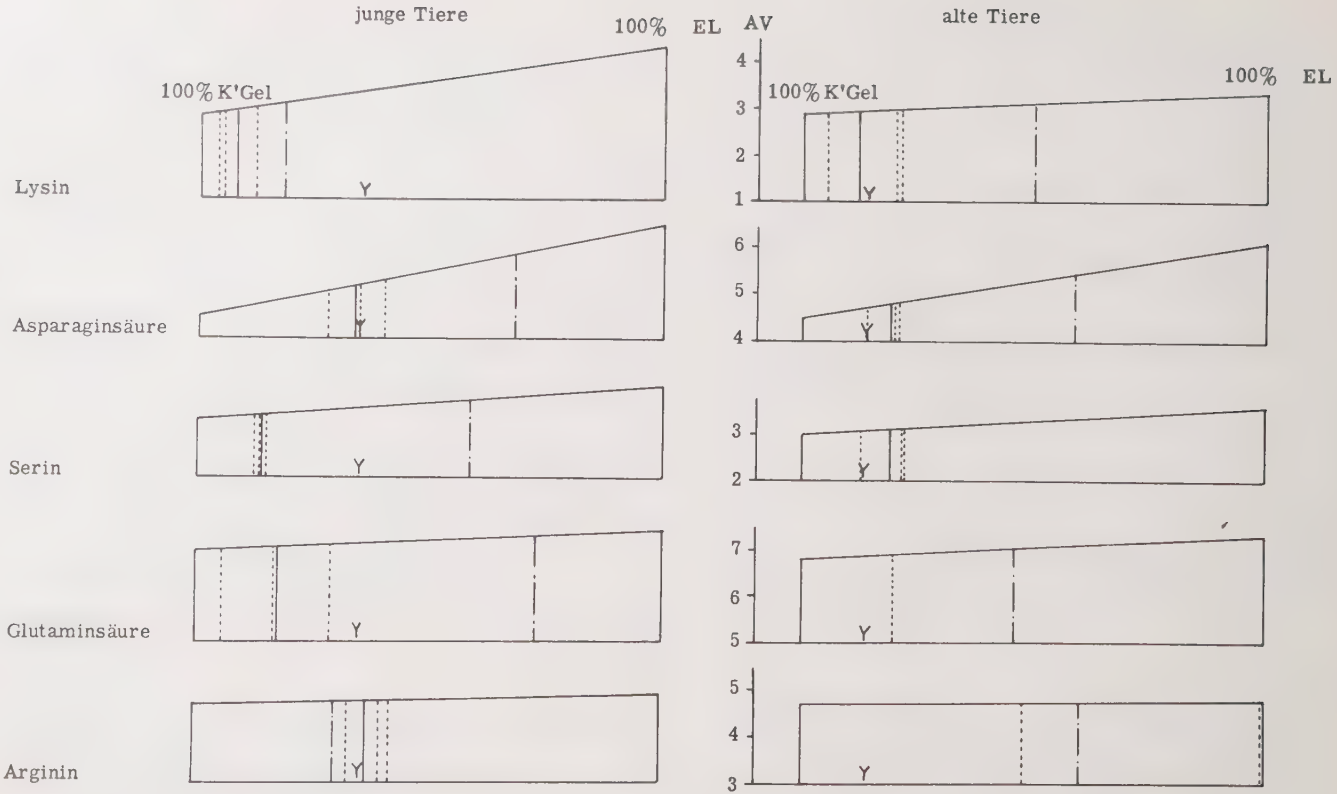

junge Tiere
100% EL
AV
alte Tiere
100% K'Gel
100% EL
100% K'Gel
100% EL
Lysin
Asparaginsäure
Serin
Glutaminsäure
Arginin
Y
4
3
2
1
6
5
4
3
2
7
6
5
5
4
3

Abb. VIII c_3

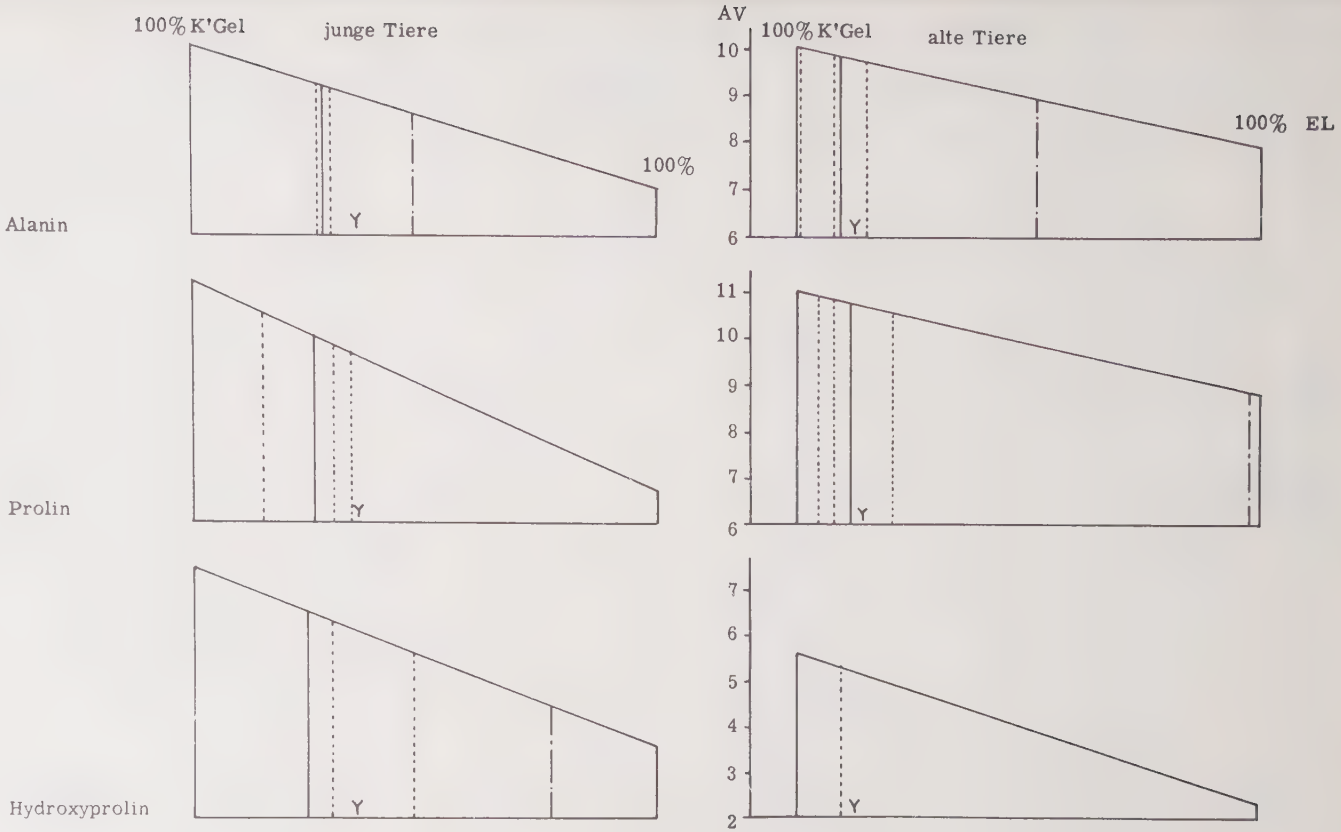
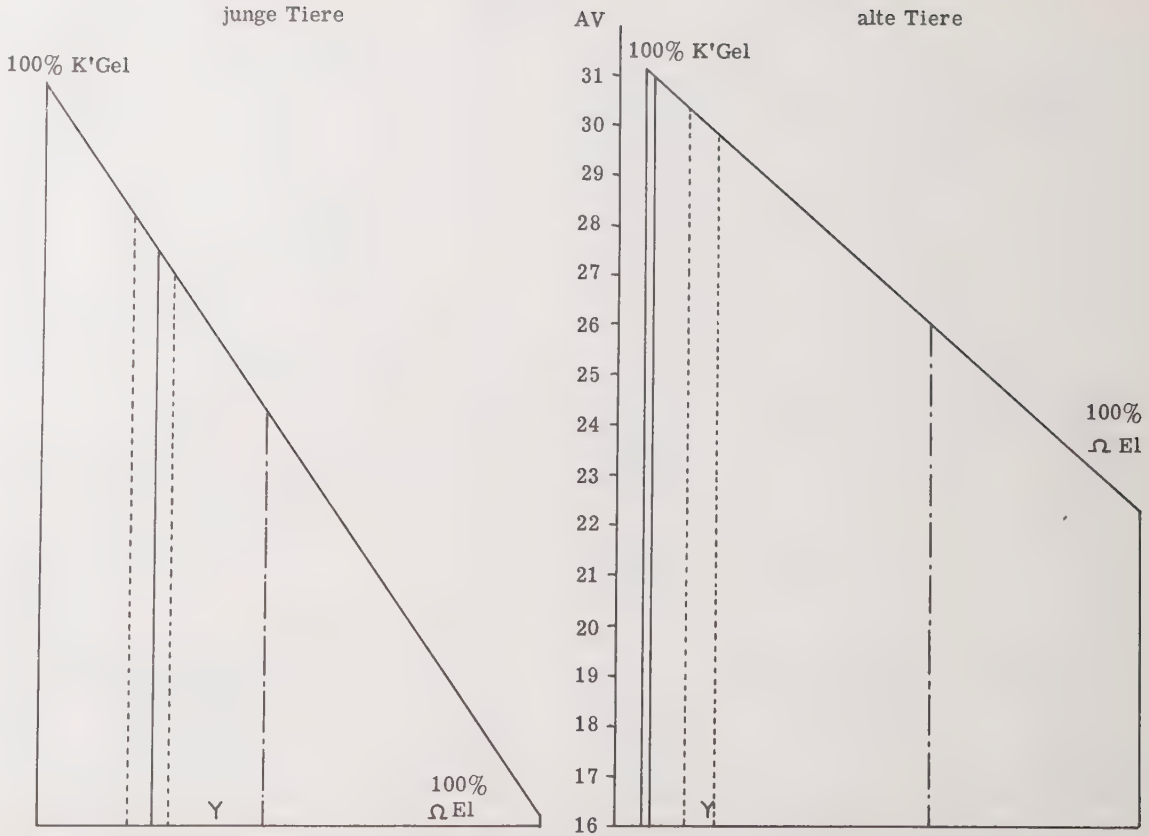

100% K'Gel
junge Tiere
100%
Y
AV
100% K'Gel
alte Tiere
100% EL
10
9
8
7
6
Alanin
11
10
9
8
7
6
Prolin
7
6
5
4
3
2
Hydroxyprolin

Abb. VIII c4



Glycin

Abb. VIII c$_5$

Legende zu Abb. IX

Verschiebung der Aminosäurezusammensetzung des Elastoids bei fortgesetzter Extraktion in dest. H_2O bei 65^o

Dargestellt sind: Die Aminosäuren (AV)-Werte des Ω-Elastoids (= Faserrückstand nach 48h Extraktion), des Faserrückstandes nach 24h Extraktion, des gewöhnlichen Elastoids (Rückstand nach 50 Min. Kontraktions- und "Wiederverlängerungszeit") und zum Vergleich die Werte der K-Gelatine 50'-Periode. Die Aminosäuren sind geordnet nach absteigenden Mengenverhältnissen Ω-Elastoid/K-Gelatine.

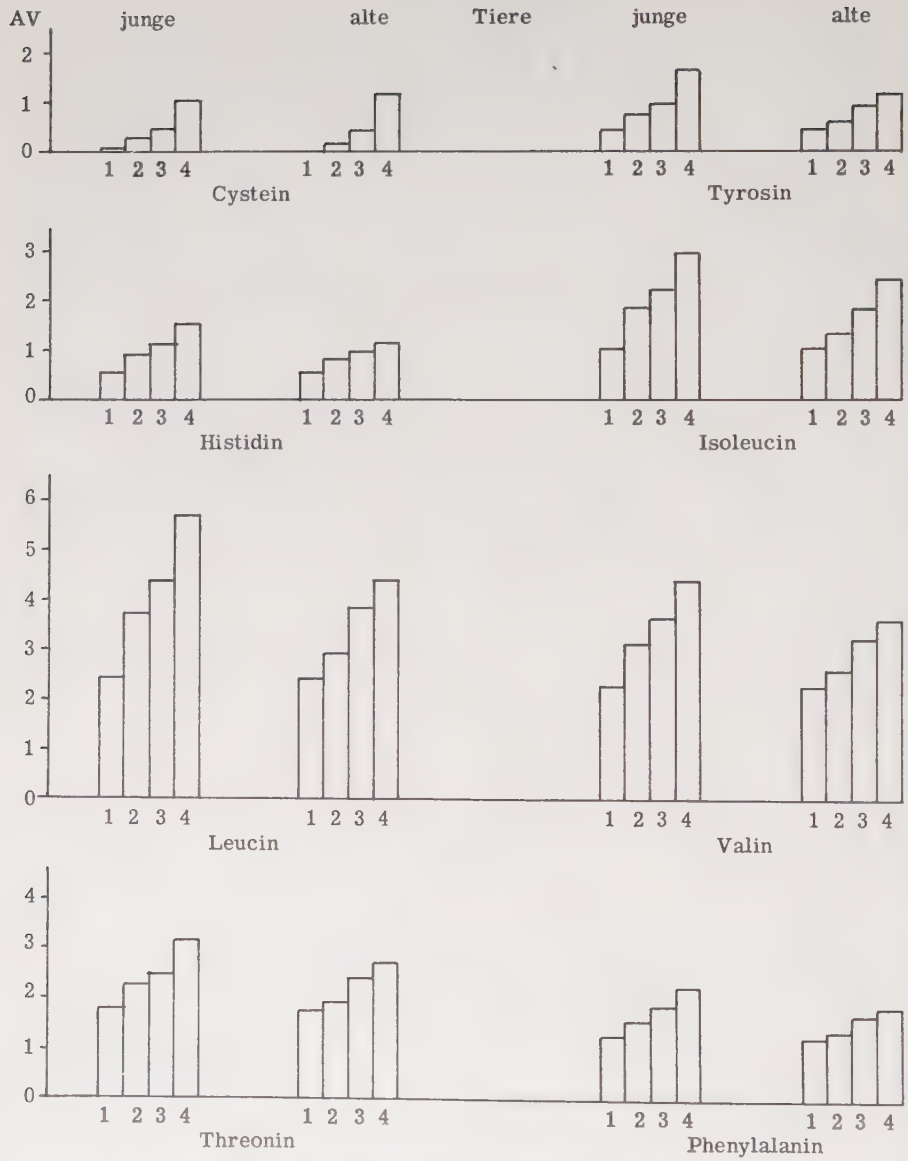


Abb. IX Verschiebung der Aminosäurezusammensetzung des Elastoids bei fortgesetzter Extraktion im Vergleich zur K'Gelatine

1. K'Gelatine
2. 50'Elastoid
3. 24^{h} Elastoid
4. 48^{h} Elastoid = Ω Elastoid

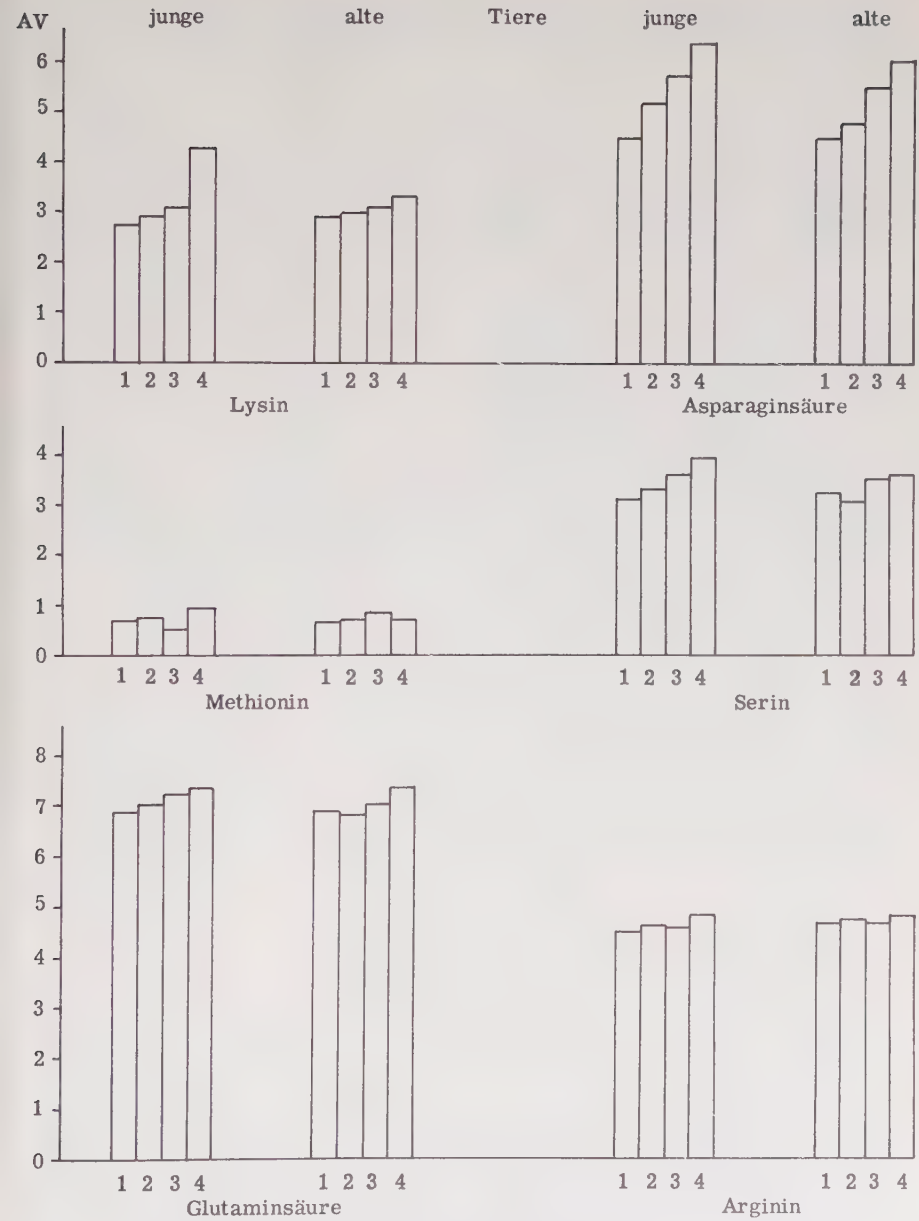


Abb. IX (Fortsetzung)

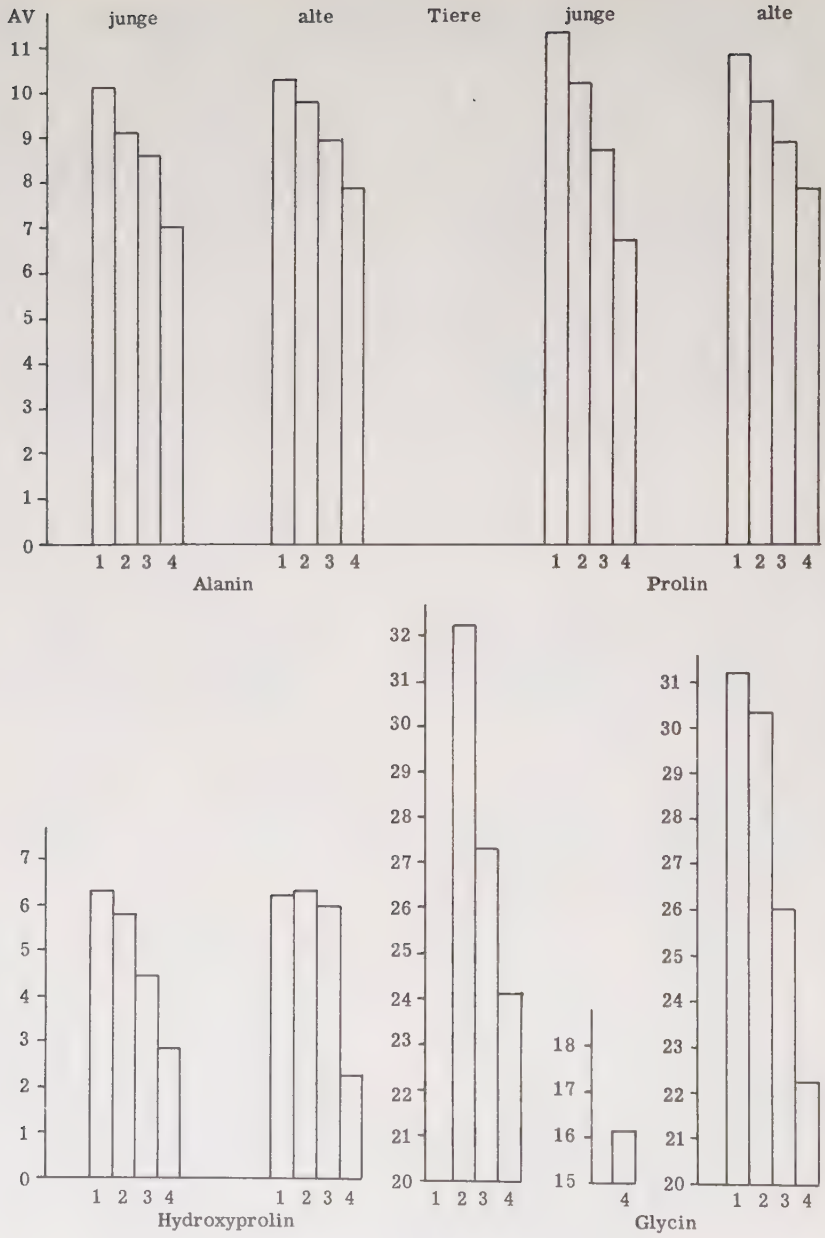


Abb. IX (Fortsetzung)

IX. Aminosäurezusammensetzung der niedermolekularen Kontraktionsfraktionen und des Waschwasserrückstandes

1. K-Dialysate

Als Folge der thermischen Kontraktion einer gewaschenen Sehne treten, wie vorher angedeutet und als D in Abb. IV und Schema 1 eingezeichnet, neben den beiden hochmolekularen Hauptfraktionen K-Gelatine und Elastoid noch dialysierbare Bruchstücke auf.

Die Aminosäureanalyse dieses Kontraktionsdialysates (Kontraktions- und Redilationsphase vereinigt) wurde wiederum je zweimal, d.h. vor und nach der Hydrolyse, ausgeführt. Aus dem Vergleich der Molsummen der Aminosäuren beider Analysen (Abb. X, Tabelle 9) geht hervor, dass in beiden Altersstufen 88 % der Aminosäuremoleküle in Peptidform vorliegen und nur 12 % als freie Aminosäuren.

Die Peptidanteile der einzelnen Aminosäuren weichen nur geringfügig von diesem Mittelwert ab. Eine Ausnahme bildet anscheinend das Tyrosin junger Tiere, das im Kontraktionsdialysat nur zu 20 % als Peptid vorliegt, während bei alten Tieren dieser Anteil 80 % beträgt, aber wiederum kaum vom Mittelwert abweicht. *)

Die Aminosäurezusammensetzung des also vorwiegend in Oligopeptidform vorliegenden Kontraktionsdialysates ist derjenigen von Kollagen sehr ähnlich.

Bei der weiter unten zu besprechenden Analyse der Interstitialflüssigkeit fanden wir eine davon gänzlich verschiedene Aminosäurezusammensetzung. Es ist also anzunehmen, dass es sich beim K-Dialysat nicht um Reste der Interstitialflüssigkeit handelt, sondern um echte, bei der Kontraktion abgespaltene Bruchstücke des vorher eine Einheit bildenden Kollagens. Aus den Aminosäureanalysen geht überdies hervor, dass das K-Dialysat in der Zusammensetzung dem Elastoid näher als der K-Gelatine steht.

---

*) Leider wurde diese Feststellung erst kurz vor der Fertigstellung der Arbeit gemacht. Während wir sonst alle Aussagen, die einen wesentlichen Unterschied zwischen jungem und altem Tiermaterial betreffen, durch völlig unabhängige Analysen verschiedener Tiere erhärtet haben, müssen wir uns für die mit * gekennzeichneten Befunde eine Nachprüfung und allfällige Berichtigung vorbehalten.

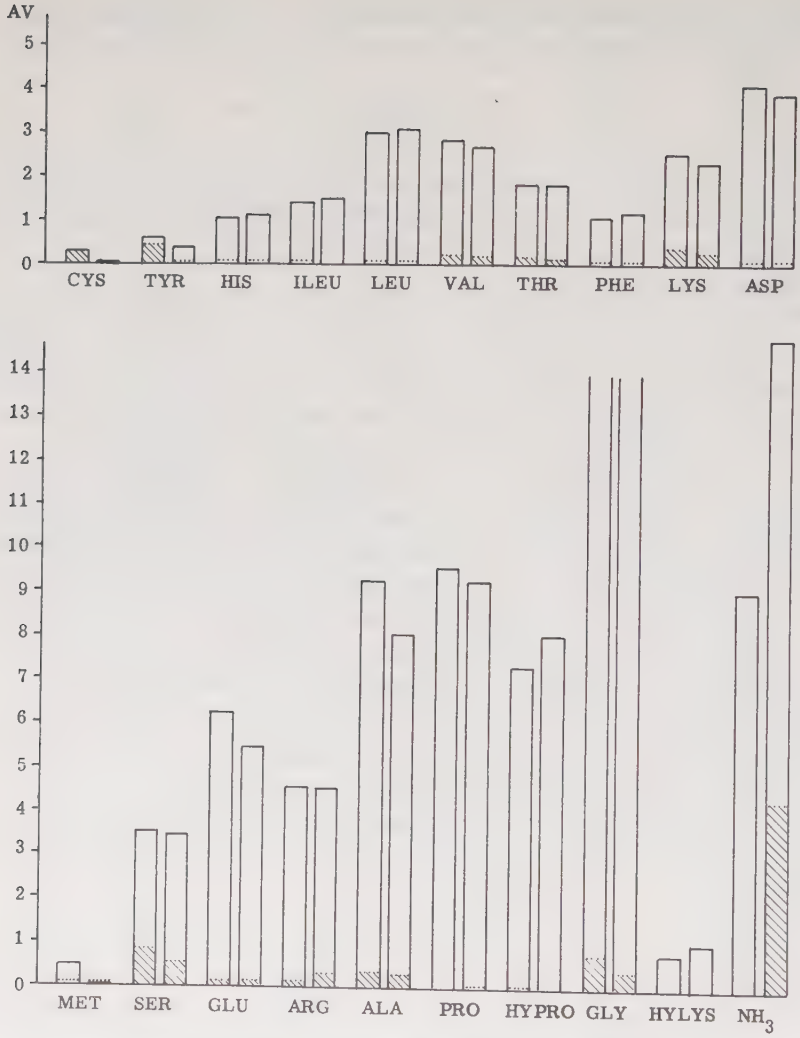


Abb. X Aminosäurezusammensetzung des K'Dialysates (Fraktion D in Abb. IV)

Je eine Bestimmung am vereinigten Material aus 5 "jungen" (d.h. 7 Monate alten Tieren - linke Säule der Abb.) und 5 "alten" (d.h. 25-32 Monate alten Tieren - rechte Säule der Abb.)

Schraffierter Teil der Blöcke : vor der Hydrolyse, also freie Aminosäuren.

Total der Blöcke : nach der Hydrolyse.

Demnach nicht schraffierter Teil = peptidisch gebundene Aminosäuren.

2. Untersuchung des Waschwasserrückstandes

a) Vorbemerkung

Wie oben schon erwähnt (Seite 18), verwendeten wir für den K-Versuch Sehnen, die durch Wässern von der Interstitialflüssigkeit befreit worden waren. Diese Massnahme war einerseits notwendig, um festzustellen, ob beim Kontraktionsvorgang neben Gelatine auch noch niedermolekulares Material frei wird; anderseits interessierte uns auch die Zusammensetzung der "Interstitialflüssigkeit" im Vergleich zu derjenigen des Kollagens. Es zeigte sich, dass der Rückstand des Waschwassers zur einen Hälfte aus nicht dialysierbarer, also kolloider Substanz, und zur anderen Hälfte aus niedermolekularem Material bestand.

b) Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils

Der kolloide, beim starken Einengen bis zur Unlöslichkeit denaturierte Teil wurde zur Aminosäure-Bestimmung wie üblich hydrolysiert. Die Aminosäure-Zusammensetzung ist in Abb. XI dargestellt. Verglichen mit Kollagen, auf gleichviel Stickstoff bezogen, weist die Kolloidkomponente der "Interstitialflüssigkeit" vor allem bedeutend weniger Arg, Hypro, Pro und Gly auf, dafür ausgesprochen mehr Val, Met, Leu, Ileu, Tyr und Phe. Es tritt ausserdem ein beim Kollagen fehlender Peak vor dem Asp auf, der wahrscheinlich durch Taurin bedingt ist. Das Auftreten einer merklichen Menge Glucosamin und Galactosamin - nach 24^{h} Hydrolyse, die diese Hexosamine zu einem grossen Teil zerstört - weist auf einen Glykoproteincharakter hin.

c) Niedermolekularer Anteil der "Interstitialflüssigkeit"

Im dialysierbaren Teil, dessen Verdampfungsrückstand sehr hygroskopisch ist, haben wir naturgemäss ein sehr komplexes Gemisch aller möglichen niedermolekularen, anorganischen und organischen Substanzen zu erwarten. Da im dünnschichtchromatographischen Vorversuch Aminosäuren und auch Peptide gefunden worden waren, haben wir die Aminosäurezusammensetzung vor und nach der Hydrolyse bestimmt (Abb. XII und Tab. 11). Im Kurvenbild der einzelnen Aminosäure-Säulenchromatogramme, die wir hier nicht wiedergeben, finden wir, wie erwartet, beim nicht hydrolysierten Material verschiedene unidentifizierte Peaks, die wir sehr wahrscheinlich als Peptide deuten müssen und deren Zuordnung zur Zeit nicht möglich ist. Dagegen lassen unidentifizierte Peaks, die auch noch nach der Hydrolyse auftreten, auf aminosäureähnliche Substanzen schliessen, die bekanntlich in der interstitialen

Körperflüssigkeit in viel grösserer Mannigfaltigkeit auftreten als in Hydrolysaten definierter Proteine, wo der Satz von Aminosäuren meist ein beschränkter ist. So finden wir vier solche Peaks vor Asp, je einen zwischen Asp und Thr, Glu und Pro sowie einen vor Met.

Die Mengenangaben (in µMol) für die bekannten Aminosäuren im Dialysat sind sowohl für die vor der Hydrolyse als auch für die nachher gemachten Analysen auf je das gleiche Gewicht des Trockenrückstandes umgerechnet, nämlich dasjenige, dessen SN nach der Hydrolyse gerade 100 Atome Stickstoff ausmacht. Auf diese Weise können die Aminosäurezusammensetzungen sowohl unter sich als auch mit denjenigen der Kollagenfraktionen verglichen werden. Die Zahlen sind in Abb. XII graphisch dargestellt.

Aus dem geringen Unterschied zwischen den Aminosäurebeträgen vor und nach der Hydrolyse können wir schliessen, dass die einzelnen Aminosäuren überwiegend in freier Form vorliegen. Das Verhältnis zwischen peptidisch gebundenen zu freien Aminosäuren ist bei jungen Tieren 0,11/0,89, bei alten 0,16/0,84. Wir können aus den Analysen jedoch nicht ersehen, ob die altersbedingten Unterschiede signifikant sind. Bei einzelnen Aminosäuren ist das Auftreten im Peptidverband etwas ausgeprägter, nämlich beim Asp 0,34 (jung) bzw. 0,32 (alt), Glu 0,41 (jung) bzw. 0,44 (alt) und bei Gly 0,26 (jung) bzw. 0,30 (alt). Beim Histidin tritt möglicherweise eine altersgebundene Besonderheit auf; die Analysengenauigkeit ist aber wegen den kleinen Mengen gering und mahnt zu vorsichtiger Beurteilung.

Beim alten Tier ist nämlich der Peptidanteil des His im Dialysat des Waschwassers (0,35) deutlich gegenüber demjenigen des jungen Tieres (0,1) erhöht. Man ist eher geneigt, an die Realität dieses Unterschiedes im Waschwasser (Seite 37) zu glauben, wenn man auf die gänzlich abhängigen Aminosäurebestimmungen der Kontraktionsfraktionen zurückgreift. Histidin ist die einzige basische Aminosäure, deren Vorkommen im Elastoid sich mit dem Alter, und zwar im Sinne einer Vermehrung, verändert.

Aehnlich wie die Aminosäurezusammensetzung des kolloidalen Teils des Waschwassers ist auch derjenige des Waschwasser-Dialysats gänzlich vom Kollagengerüstaufbau verschieden. Bei einem gegenseitigen Vergleich der Waschwasserkomponenten unter sich unterscheidet sich die Zusammensetzung des Dialysats von demjenigen des Kolloidanteils dadurch, dass im Dialysat wesentlich kleinere Mengen folgender Aminosäuren vorhanden sind: Arg, Asp, Thr, Cys, Val, Ileu, Leu und Phe; also zur Hauptsache gerade diejenigen Aminosäuren, welche auch den Unterschied der beiden Kollagengerüste, der Kontraktionsgelatine und des Elastoids, kennzeichnen.

Bei einem Versuch, aus der graphischen Darstellung (Abb. XII) allfällige altersbedingte Unterschiede herauszulesen, fällt zunächst auf, dass das Hydrolysat des Waschwasserdialysats bei alten Tieren bedeutend mehr Ammoniak enthält. Da aber die dialysierbare Interstitialkomponente zweifelsohne von dem gesamten humoralen Stoffwechsel abhängt, lässt sich diese Besonderheit ohne weiteres mit einer Funktionsverminderung der Exkretionsorgane erklären.

Die grosse Menge des Ammoniaks im Waschwasserdialysat alter Tiere erschwert bei dieser Fraktion einen direkten Vergleich der Aminosäurewerte der alten mit denjenigen der jungen Tiere. Diese Schwierigkeit können wir umgehen, indem wir einfach die Quotienten "Aminsoäurewert alt"/"Aminosäurewert jung" bilden und diese unter sich vergleichen. Die Quotienten liegen mehrheitlich zwischen 0,7 und 0,8. Aus der Reihe fallen lediglich Gly mit 0,59 Ala mit 0,53 und allenfalls Glu mit 0,63. Dies würde - unter Vorbehalt (Seite 65*)) - bedeuten, dass das freie Vorkommen dieser drei Aminosäuren in der Interstitialflüssigkeit mit dem Alter abnimmt.

3. Aminosäurezusammensetzung von "Tropo- und Prokollagen"

Die Aminosäurezusammensetzung von Tropo- und Prokollagen[84] (Extrakte aus Sehnenmaterial von 3 - 4 Monate alten Tieren) ist in Abb. XIII und Tabelle 12 zusammengestellt; als Vergleich wurde die Aminosäurezusammensetzung von K-Gelatine und von Elastoid (50-Minuten-Periode von 7 Monate alten Tieren) genommen.

Es fällt auf, dass vor allem das mit Citratpuffer und Essigsäure erhaltene Extrakt ("Prokollagen") praktisch gleich wie K-Gelatine zusammengesetzt ist.

Die Zusammensetzung des NaCl-Extrakts ("Tropokollagen") gleicht merkwürdigerweise (wenn wir von ganz wenigen Aminosäuren, wie z.B. Lysin, absehen) mehr derjenigen des Elastoids (50-Minuten-Periode). Dies zeigt sich sowohl bei den im Elastoid typisch vermehrten Aminosäuren (Asp, Thr, Ser, Leu, Ileu) als auch bei den im Elastoid verminderten (Gly, Pro, Ala). Dieses Verhalten ist umso merkwürdiger, als die in unseren Versuchen herausgelösten Substanzteile an Tropo- und Prokollagen recht klein*) waren, so klein, dass die Sehne nach der Behandlung das ursprüngliche Aussehen und die Fähigkeit zur thermischen Kontraktion jeweils fast unverändert beibehielt.

---

*) vgl. Seite 30

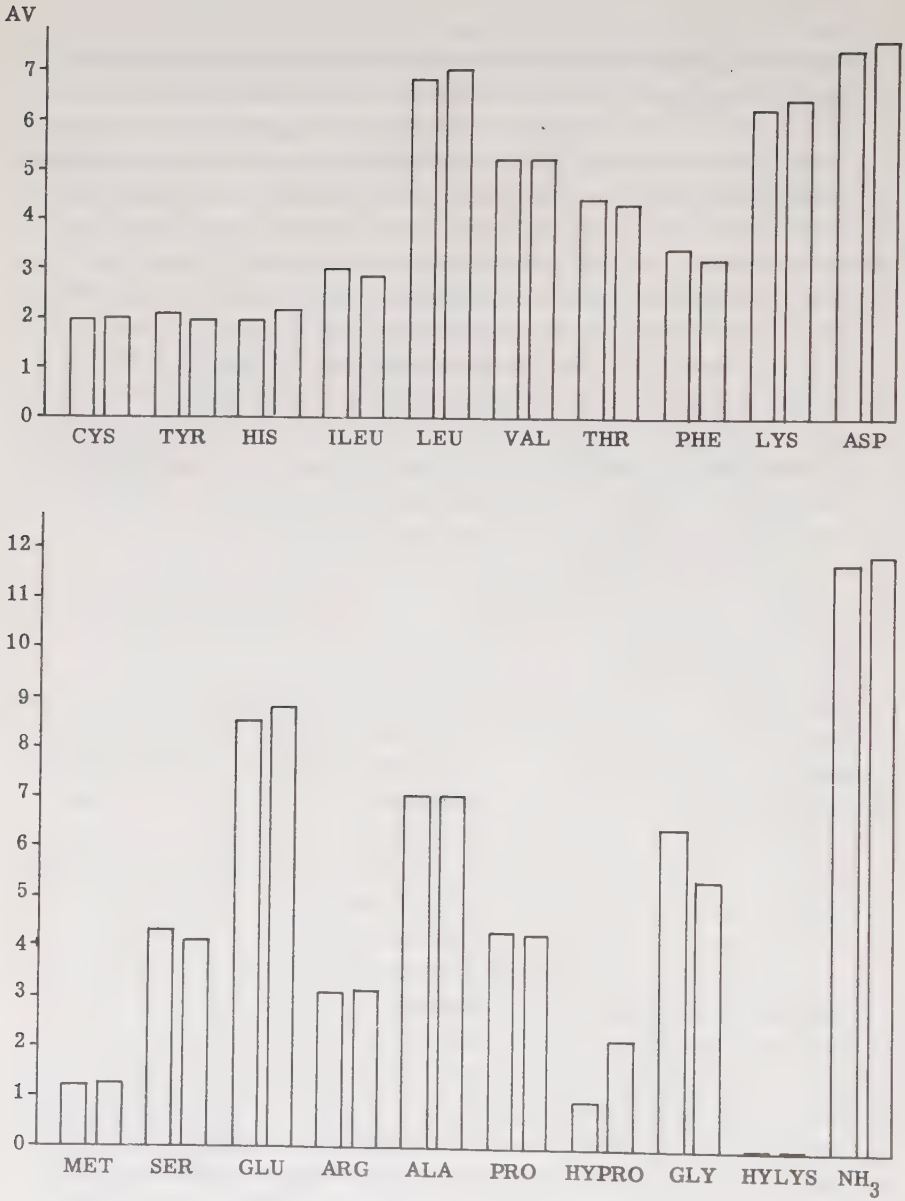


Abb. XI Kolloidanteil des Waschwassers nach der Hydrolyse

linke Säule junge Tiere
rechte Säule alte Tiere

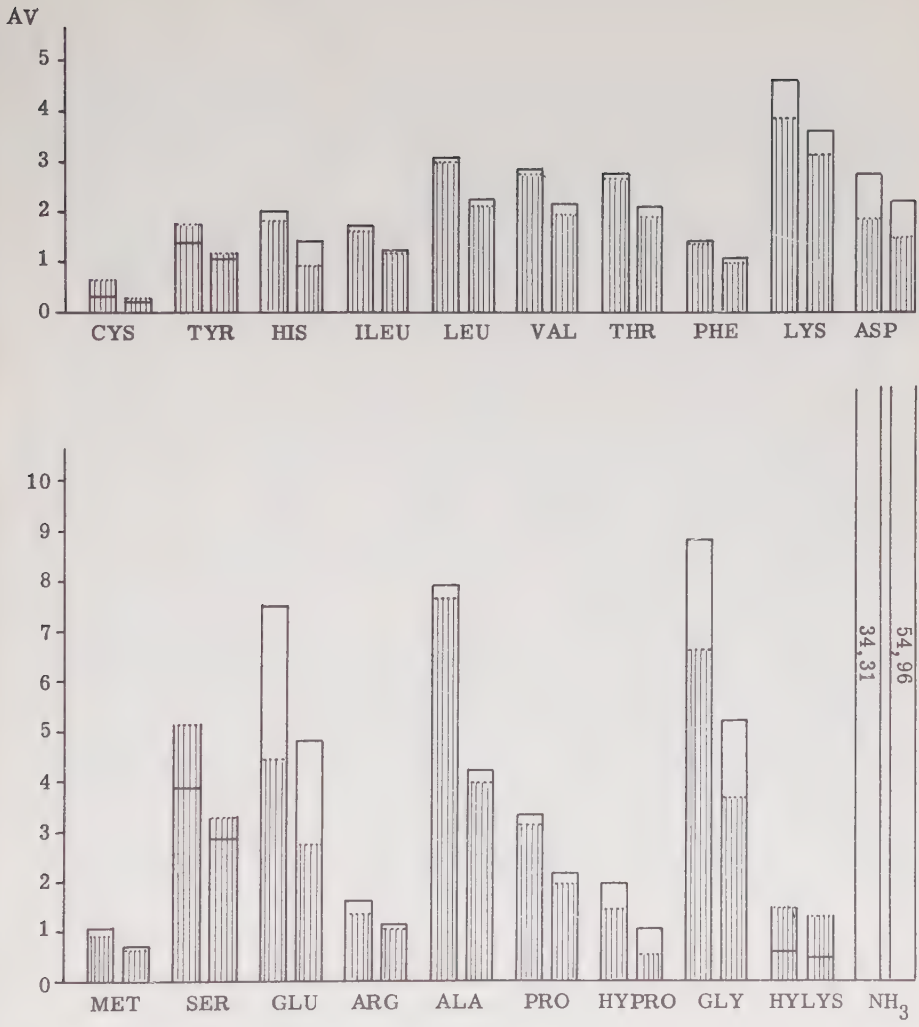


Abb. XII Waschwasser (Interstitialflüssigkeit) junger und alter Tiersehnen vor und nach der Hydrolyse

Aminosäurezusammensetzung des dialysierbaren Teils des Waschwasserrückstandes (in Abb. IV. Fraktion E).
Je eine Bestimmung am vereinigten Material aus 5 jungen und 5 alten Tieren.
Schraffierter Teil der Blöcke : Vor der Hydrolyse. Bis zum ausgezogenen obersten Querstrich: Nach der Hydrolyse. (Ausnahmen : Cys, Tyr, Ser, Hylys.)

4. Unidentifizierte Peaks und Aminozucker

Ausser den leicht identifizierbaren "klassischen" Aminosäuren traten in den Säulenchromatogrammen mit grosser Regelmässigkeit immer wieder an den gleichen Stellen kleine Nebenpeaks auf, deren Identifizierung bisher noch nicht möglich war. Bei wenigen Analysen, bei denen aus äusseren Gründen die zur Chromatographie gelangende Probe klein war, war die Feststellung einzelner der unidentifizierten Nebenpeaks unsicher. Wir können deshalb nicht entscheiden, ob die unidentifizierbaren Nebenpeaks allen Fraktionen, einschliesslich Pro- und Tropokollagen, zukommen oder bei einigen Fraktionen teilweise ausbleiben.

Bemerkenswert ist jedoch das Auftreten von Aminozuckern. Glucosamin und Galactosamin werden durch die saure Hydrolyse stark angegriffen. Immerhin bleiben erfahrungsgemäss Mengen von der Grössenordnung 0,2 bis 0,6 µMol/10 mg auch nach 24 stündiger Hydrolyse erhalten und können im Chromatogramm festgestellt werden. Obschon auf eine Zahlenangabe verzichtet werden muss, ist aber in jedem Fall eine Aussage möglich, ob nennenswerte Mengen vorhanden waren oder nicht. Ein Vergleich aller unserer Resultate in bezug auf bestimmbare Aminozucker[58] führte zu folgender Feststellung:

Natives Kollagen sowie alle Fraktionen, die bei der thermischen Kontraktion anfallen, enthalten sowohl Glucosamin als auch Galactosamin, das 24^h-Elastoid und besonders Ω-Elastoid in etwas vermehrtem Masse.

Im Gegensatz dazu konnten bei unseren kalt extrahierten Fraktionen (Tropo- und Prokollagen) nennenswerte Mengen Hexosamin mit Sicherheit ausgeschlossen werden, was mit den Befunden anderer Autoren übereinstimmt. Beispielsweise fanden Hörmann und andere[59] in "gereinigtem Kollagen" (was nichts anderes als umgefälltes Prokollagen ist) zwar Neutralzucker, aber nur Spuren von Aminozukkern, die überdies bei wiederholter Umfällung verschwinden.

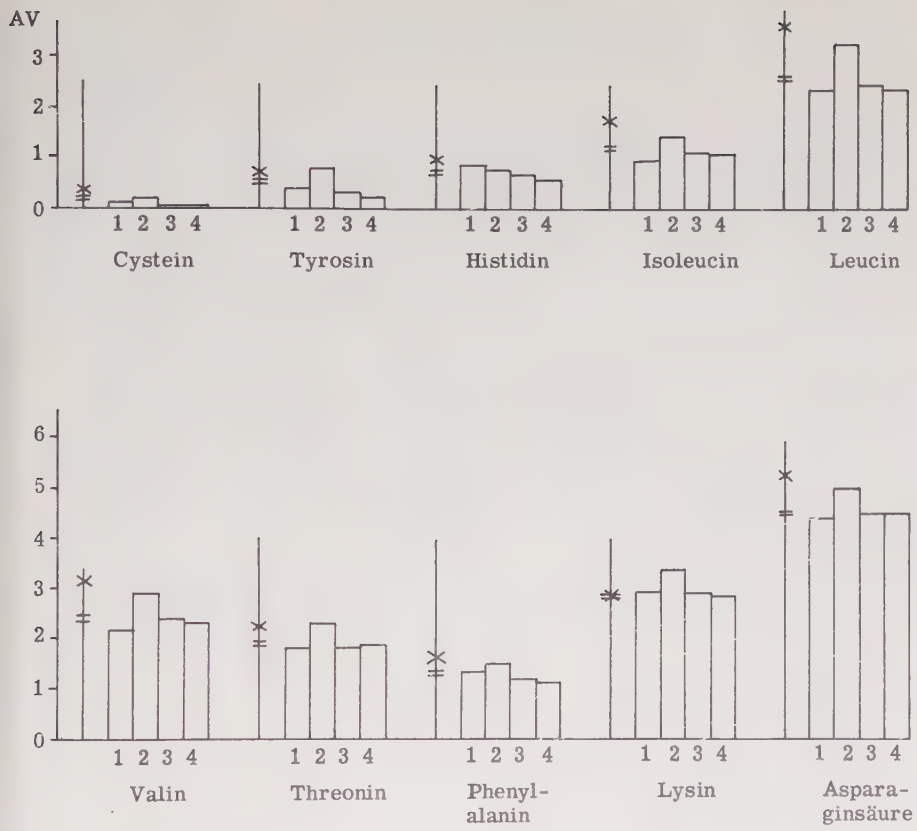


Abb. XIII Aminosäurezusammensetzung von "Tropo- und Prokollagen"
Es bedeuten die Säulen:

1. K'Gelatine 50' Periode als Vergleich
2. Tropokollagen = NaCl-Extraktion
3. Prokollagen = Citratpuffer "
4. Prokollagen = Essigsäure "

Die links von der Säule angeführten Marken sind Werte des nativen Kollagens und x Elastoids der 50'Periode

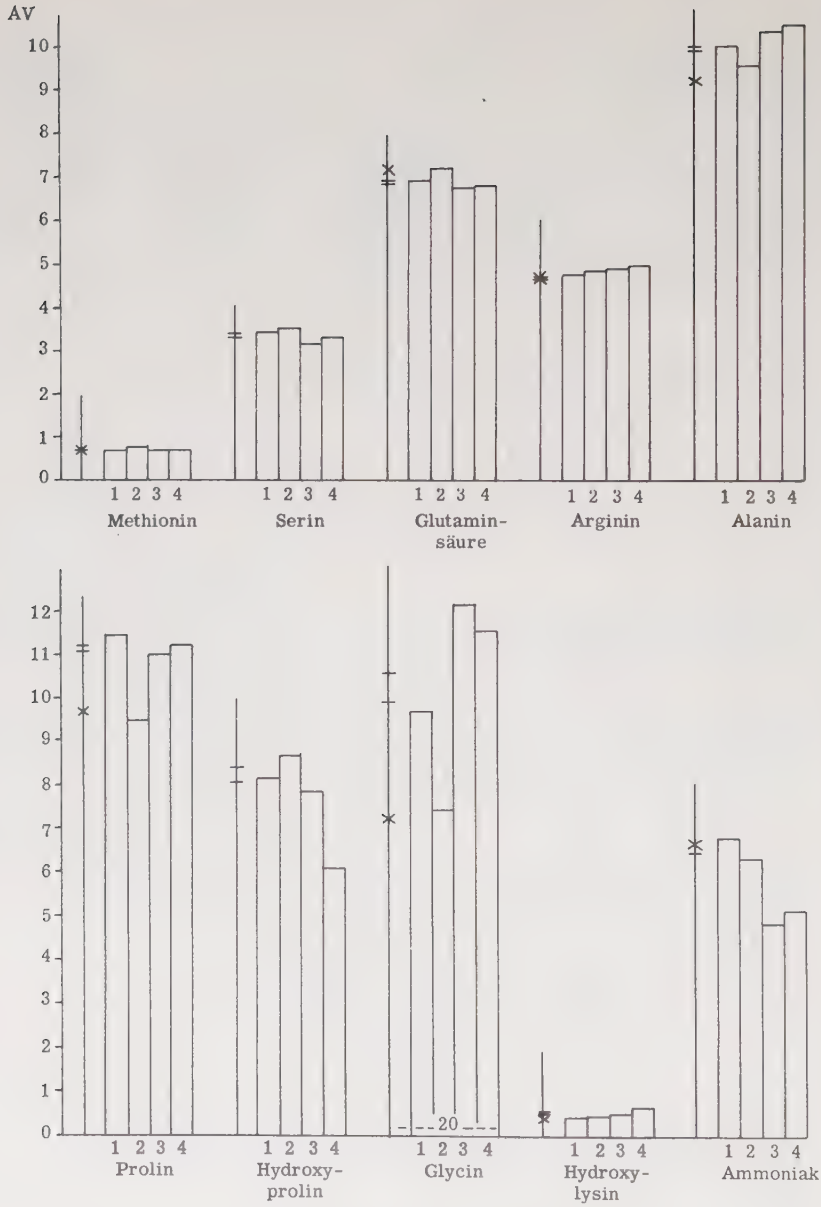


Abb. XIII (Fortsetzung)

Legende zu Abb. XIV

Elastin

In unserem Laboratorium haben wir auch die Aminosäurezusammensetzung einer weiteren Bindegewebsart, des Elastins (Lig. nuchae) eines 3 Wochen alten Kalbes sowie einer 14jährigen Kuh, untersucht. Dabei stellten wir fest, dass zwischen Kollagen und Elastin sehr grosse Unterschiede bestehen. Junges Elastin unterscheidet sich - im Gegensatz zum Kollagen - beträchtlich von altem in bezug auf den Gehalt einer ganzen Gruppe von Aminosäuren.

Die einzelnen Ergebnisse können folgendermassen zusammengefasst werden:

1. Kein bemerkenswerter Unterschied zwischen jungem und altem Elastin ist bei folgenden Aminosäuren zu bemerken: His, Arg, Thr, Ser und Tyr.
2. Bei jungen Tieren liegen die Werte von Asp, Glu, Met und Hypro um ein weniges höher, bei Gly fast um ein Viertel und bei Lys liegen sie sogar beinahe doppelt so hoch.
3. Im Gegensatz dazu weisen die lipophilen Aminosäuren Ileu, Leu und Phe bei altem Elastin etwas höhere Werte auf. Noch stärker erhöht sind Val, Prol und besonders Ala.

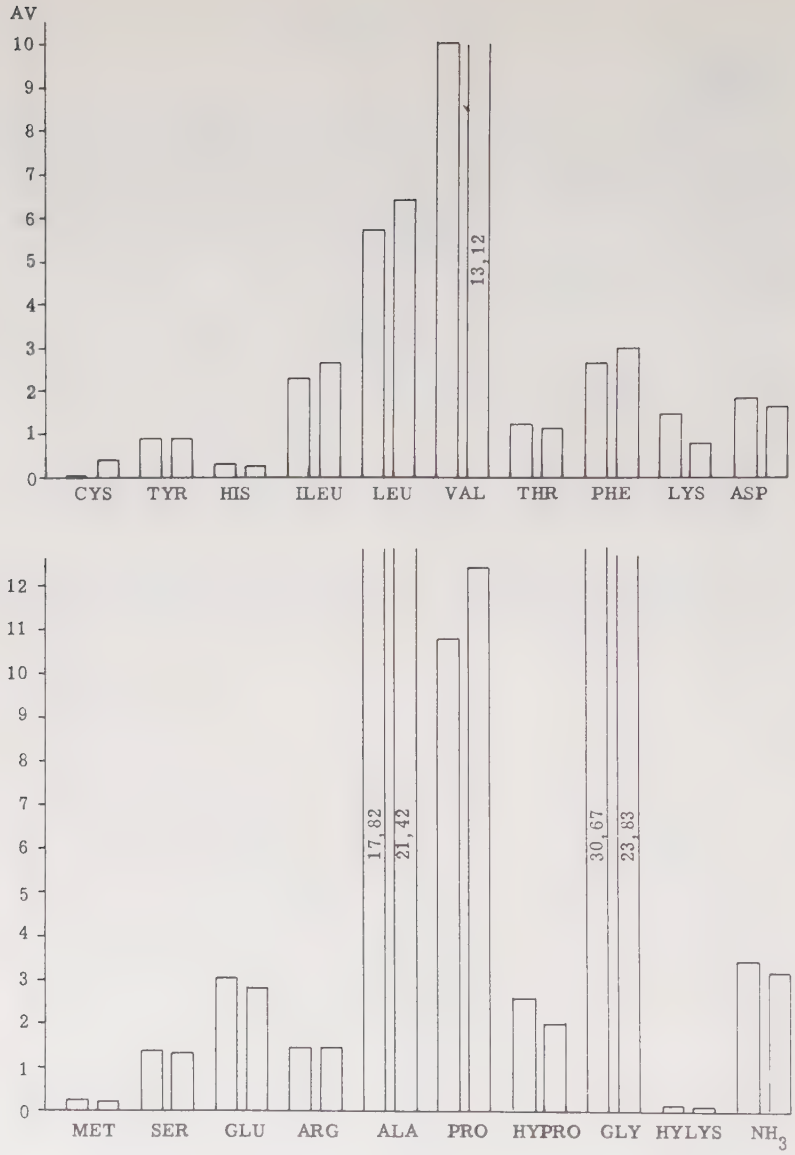


Abb. XIV Aminosäurezusammensetzung von Elastin

Linke Säule 3 Wochen altes Kalb
Rechte " 14 jährige Kuh

X. Diskussion

1. Das physikalische Modell der Kontraktion

Wir wollen im folgenden versuchen, die Kenntnisse über die thermische Kontraktion, einschliesslich unseren eigenen Beobachtungen, anhand eines plausiblen Strukturbildes zusammenzufassen. Vorerst sei daran erinnert, dass der Effekt der thermischen Kontraktion von kollagenem Bindegewebe lange vor seiner ersten wissenschaftlichen Bearbeitung bekannt war. Es ist eine alltägliche Beobachtung, dass sich beim Braten von Fleisch die Bindegewebspartien mit grosser Kraft zusammenziehen. Die Kopfjäger stellten sich von jeher verkleinerte Kopftrophäen her, indem sie die gesamte Kopfhaut durch Füllen mit heissem Sand zum Schrumpfen brachten. Die wissenschaftliche Bearbeitung des Phänomens setzte 1871 mit den Experimenten von Rollet[34] ein. Unsere Feststellungen, dass die thermische Kontraktion einer Sehne im Wasser bei 65° zu einem Zerfall in eine Gerüstkomponente "Elastoid" und in lösliche K-Gelatine führt, und die quantitative und chemische Verfolgung des Zerfalls haben vor allem die Beschreibung des Kontraktionsvorganges ergänzt. Es bereitet nun keine Schwierigkeiten mehr, den Effekt anhand eines physikalischen Modells zu verstehen. Wir nehmen als gegeben an, dass eine Sehnenfaser aus parallel aneinander gereihten Peptidbündeln aufgebaut ist. Damit ein solches Gebilde bei Zimmertemperatur stabil ist, müssen zwischen den Bündeln Zusammenhangskräfte bestehen, die verhindern, dass die Peptidketten nicht schon bei Körpertemperatur, als Folge der Wärmebewegung, einer Knäuelform zustreben. Ein solcher Effekt ist ja bekanntlich die Ursache der Kautschukelastizität: Gestreckter Kautschuk übt eine Kraft aus und kann beim Zusammenziehen Arbeit leisten[61]. Die dazu nötige Energie entnimmt er als Wärme der Umgebung. Zum Zustandekommen der Kautschukelastizität ist, ausser dem Vorhandensein von Fadenmolekülen, noch nötig, dass diese zwar gegeneinander beweglich, jedoch durch genügend Vulkanisierungspunkte an einzelnen Stellen verknüpft sind. Wenn diese Verbindungsstellen fehlten, wäre Kautschuk nicht elastisch, sondern würde sich unter Deformation plastisch verformen (unvulkanisierter Rohkautschuk). Im Falle der Sehne können wir einen Aufbau von zwei verschiedenen Sorten von Ketten postulieren, welche beide gemeinsam zur Zugfestigkeit der nativen Sehne beitragen. Die eine Sorte, die Elastoidkomponente, ist dank ihrem grösseren Gehalt an hydrophoben Gruppen (Val, Leu usw.) und durch S-S-Brücken etwas stärker in sich vernetzt als die andere. Werden die Querverbindungskräfte, die die Peptidketten in paralleler Lagerung zusammenhalten, irgendwie unwirksam gemacht, so kann die Knäuelungstendenz zur Auswirkung kommen.

Das Aufheben dieser Querverbindungskräfte kann einerseits schon bei Zimmertemperatur durch bestimmte Elektrolyte geeigneter Konzentrationen (Donnan-Gleichgewicht) bewirkt werden, was verständlich macht, dass auch mit solchen Mitteln eine Kontraktion ausgelöst werden kann. Anderseits haben die Moleküle reinen Wassers bei einer Temperatur von 65° offenbar genügend kinetische Energie, um die Querverbindungskräfte zu sprengen. Am Zustandekommen der kautschukähnlichen Zugkräfte sind, wenigstens beim ersten Einsetzen der Kontraktion, alle Peptidketten beteiligt. Mit dem Fortschreiten des Kontraktionsvorganges beginnen allerdings die unter sich und mit den übrigen Protofibrillen weniger vernetzten Kettenteile aus dem Verband herauszufallen und nicht mehr zur Zugkraft beizutragen. In der Tat nimmt ja im Laufe der Kontraktion die Zugkraft immer mehr ab, was sich darin äussert, dass die Faser unter dem Einfluss des kleinen angelegten Gegenzugs schliesslich wieder dilatiert. Die Beobachtung von Wöhlisch[46], dass die Kontraktion mit einer Wärmeaufnahme verbunden ist, bestätigt übrigens die beschriebene kinetische Vorstellung über das Zustandekommen einer Kontraktion, bloss stimmt sein Postulat, die Kontraktion sei ein reversibler Vorgang, höchstens teilweise mit der Realität überein (vergl. auch Küntzel[40] usw.). In einem gewissen Sinn äussert sich die Reversibilität darin, dass man durch ein Gestreckthalten sowohl die Kontraktion und das Glasigwerden als auch den Zerfall in die Komponenten verhindern kann. Ist aber einmal eine Komponente in Lösung, also in den ungeordneten Zustand übergegangen, so kann von einer Reversibilität im Sinne eines Rückgängigmachens nicht mehr die Rede sein.

Zur Erklärung des Effekts, dass die Kontraktion durch Gestreckthalten verhindert werden kann, ist allerdings die rein thermodynamische Betrachtung zu summarisch. Die Erklärung wird viel plausibler, wenn man die Kenntnisse des strukturellen Feinbaus beizieht. Insbesondere wird die elektronische Querstreifung eine wertvolle Hilfe bieten, wenn wir diese ähnlich wie Grassmann*) so deuten, dass periodisch längs der Faserrichtung Partien mit grösseren und solche mit kleineren Querzusammenhangskräften abwechseln. Bestünde die Faser aus einem Band paralleler, der Länge nach homogener Fäden, wie der Zettel eines Webstuhls, so könnte ein Auseinanderspreizen der Fasern durch Quellungskräfte das gesamte Bündel nur sehr wenig verkürzen. Gemäss elementaren physikalischen Gesetzen würde durch einen noch so grossen Längszug der Spreizung kein nennenswerter mechanischer Widerstand entgegengesetzt. Anders liegt der Fall, wenn wir annehmen, dass periodisch Partien mit festerem Querzusammenhalt auftreten. Mässige Quellungskräfte würden

*) Aus seiner Anschauung, dass ein Wechsel zwischen grösserem und kleinerem Ordnungszustand auftritt, kann ein Wechsel zwischen grösserem und kleinerem Querzusammenhang unschwer gefolgert werden.

dann die schwachen Partien zuerst angreifen. Bei genügend feiner Unterteilung bewirkt aber Spreizung der freien Partien eine merkliche Gesamtverkürzung. In diesem Falle kann ein Längszug auf die gespreizten Partien auch einen merklichen Querdruck zur Folge haben, der geeignet ist, die Spreizungskräfte zu kompensieren*). Es ist also verständlich, dass ein angelegter Längszug die Kontraktion und ihre Folgen wirksam verhindern, bzw. auf eine höhere Temperatur, die auch die fester gebundenen Partien angreift, verlagern kann.

2. Modifizierte Auffassung des Alterns

Wir sind zur Deutung des Kontraktionsvorganges ausgegangen von einem Strukturbild, in welchem zwei Sorten von Peptidketten nebeneinander liegen. Diese beiden Sorten würde man also nach dem Kontraktionsvorgang getrennt als K-Gelatine bzw. als Elastoid vorfinden. Wir haben aber schon auf Seite 26 bewusst vermieden, mit dem Gebrauch des Wortes "Komponente" das Vorliegen zweier klar unterscheidbarer Bausteine im nativen Kollagen zu postulieren. Bei einem Gemisch aus niedermolekularen Komponenten wäre eine derartige Vorsicht bei der Formulierung überflüssig. Im makromolekularen Bereich ist dagegen der Begriff "einheitliche Komponente" mit grösserer Vorsicht zu gebrauchen. Es ist bei Kettenmolekülen nämlich durchaus denkbar, dass es einer grösseren Energie bedarf, zwei durch viele Nebenvalenzen zusammengehaltene Ketten zu trennen als eine einzelne Hauptvalenz in der Kette zu sprengen. Zusätzlich können ja auch eigentliche Querverbindungen zwischen parallelen Ketten bestehen. Es ist auch ein gleitender Uebergang denkbar zwischen einer aus nur aus zwei Sorten parallel gelagerten Ketten bestehenden Struktur und einer solchen, bei welcher mehr oder weniger feste bzw. mehr oder weniger zahlreiche Bindungen zwischen der einen und der anderen Komponente bestehen, so dass Kettenteile vorkommen können, deren Zugehörigkeit zur einen oder anderen Komponente nicht mehr entschieden werden kann. Durch die auf Seite 47 diskutierte Beobachtung, dass bei fortschreitender Extraktion der löslichen Komponente deren Zusammensetzung sich verändert und, besonders bei alten Sehnen, sich mehr derjenigen der unlöslichen Komponente angleicht, wird die Fragwürdigkeit der Vereinfachung, von "zwei Komponenten" zu sprechen, besonders deutlich. Dieser Sachverhalt kann für unsere Vorstellungen über das Altern sehr bedeutsam werden. Es wird zwar heute

*) Eine rohe Ueberschlagsrechnung hat gezeigt, dass bei den in unseren Versuchen vorliegenden Kräften eine Unterteilung in ca. 100 Å lange Segmente genügen würde, um den kinetischen Spreizungskräften wirksam begegnen zu können.

vielfach postuliert, dass das Altern des Kollagens mit einer zunehmenden Vernetzung verbunden sei.[62] Schlüssige und direkte Beweise für diese Auffassung stehen aber noch aus. Wie die folgenden Ueberlegungen zeigen werden, führt die Deutung unserer analytischen Ergebnisse zur Annahme einer mit dem Alter zunehmenden Vernetzung:

Beim jungen Kollagen ist es, wenigstens bis zu einem gewissen Grade, sinnvoll, von zwei deutlich verschiedenen Komponenten zu reden. Diese lassen sich im Kontraktionselement rasch und weitgehend voneinander trennen. Aber bereits hier ist der Trennungsvorgang nach 50 Min. nicht vollständig; es bedarf, obwohl der unlösliche Rest durch Quellung gewaltig aufgelockert ist, weiterer andauernder Temperaturbehandlung, um die letzten Reste aus dem Verband des unlöslichen Körpers zu befreien. Bei völliger Abwesenheit von Querverbindungen zwischen beiden Komponenten wäre eine solche Verzögerung des Herauslösens kaum verständlich. Mit zunehmendem Alter aber wird der Anteil des rasch in Lösung Gehenden immer kleiner. Dies kann aber nicht einfach davon herrühren, dass sich das Mengenverhältnis zweier klar geschiedener Komponenten mit dem Alter verschoben hat, denn es zeigt sich ja im 48^h-Extraktionsversuch, dass das Mengenverhältnis Ω-Elastoid/K-Gelatine nur sehr wenig mit dem Alter zunimmt. Wir sind im Gegenteil zur Annahme gezwungen, dass in der Gesamtstruktur die Zahl der Bindungen von K-Gelatine an das unlösliche Gerüst mit dem Alter zunimmt. Dann wird ohne weiteres verständlich, dass erst eine verlängerte thermische Einwirkung des Wassers auch die stärker mit dem Ω-Elastoid verbundene K-Gelatine-Stücke freisetzt, wobei allerdings Elastoidbruchstücke mit aus dem Verband herausgerissen werden.

3. Vergleich unserer Ergebnisse mit Ergebnissen bei löslichem Kollagen

Wir haben uns noch mit einem wichtigen Befund aus der Literatur auseinanderzusetzen, dessen Zusammenhang mit unseren experimentellen Ergebnissen noch nicht restlos geklärt ist.

Aus den zahlreichen physikochemischen und analytischen Arbeiten über die löslichen Kollagene aus sehr jungem Tiermaterial greifen wir die Ergebnisse von Piez[63] als Beispiel heraus:

Salzextrahiertes, lösliches, durch Umfällen gereinigtes Kollagen aus jungem Gewebe, also Tropokollagen, zerfällt beim Erwärmen auf 40^o ("Denaturierung") in zwei chromatographisch (Carboxymethylcellulose) trennbare Komponenten. Deren eine, α_1 genannt, macht 2/3 der Menge aus und ist in der Zusammensetzung eher

unserer K-Gelatine ähnlich, die andere, α_2, 1/3 der Menge, gleicht eher dem Ω-Elastoid.

Die Analogie zu unserem - ebenfalls durch Wärme ausgelösten - Zerfall des "erwachsenen" Kollagens in zwei analytisch verschiedene Komponenten fällt natürlich sofort auf, doch bereitet deren Interpretation gewisse Schwierigkeiten.

Tropokollagen gilt, da es direkt von den Fibroblasten ausgeschieden worden ist und wegen seiner Löslichkeit in NaCl-Lösung von ungefähr physiologischer Konzentration, als die eigentliche Vorstufe des Kollagens. Seine Aminosäurezusammensetzung ist von derjenigen des Prokollagens, das man sich sekundär aus dem Tropokollagen entstanden denkt, und auch von derjenigen des fertigen Kollagens nach unseren Befunden verschieden, und zwar im Sinne einer Verschiebung zur Elastoidzusammensetzung. Das im Embryonalalter reichlich extrahierbare Tropokollagen hat also eine auffallende chemische Aehnlichkeit mit der unlöslichen Komponente des erwachsenen Kollagens, dem Elastoid. Ueberdies besitzt Tropokollagen in der erwähnten α_2-Fraktion eine Komponente, die analytisch in naher Beziehung steht zum Ω-Elastoid. Beide, α_2-Komponente und Ω-Elastoid, zeigen die auffallende Vermehrung in der lipophilen Gruppe der Aminosäuren und eine Verminderung in der Gruppe Pro, Hypro, Gly und Ala im Vergleich zur bekannten Kollagenzusammensetzung in noch höherem Masse als das Tropokollagen. Die Vermutung, dass sich das Ω-Elastoid aus der α_2-Komponente des Tropokollagens gebildet hat, liegt nahe. Die Umwandlung des Kolloidproteins in die Gerüstsubstanz ist dann aber nur durch eine intermolekulare-hauptvalenzartige Vernetzung zu erklären. Die Kontinuität, die von der α_2-Komponente zum Ω-Elastoid führt, ist allerdings vorerst eine Hypothese, deren Beweis noch aussteht.

Wenn, wie behauptet wird, Tropokollagen die Urform ist, die von den Fibroblasten ausgeschieden wird, die nachher in extrazellulärer Umwandlung in der Faser in das Prokollagen übergeht, ist die Veränderung der Aminosäurezusammensetzung (Uebergang von "Elastoidähnlichkeit" in "K-Gelatineähnlichkeit") nur schwer zu erklären. Das Kollagen müsste dann ja an den im Tropokollagen vermehrten Aminosäuren (lipophile Gruppe) verarmen und dafür mehr Pro und Hypro einbauen.

Betrachten wir aber das Prokollagen ebenfalls als eine in den Zellen gebildete Substanz, die sich dem Tropokollagen beigesellt, so können wir die auffallende Konstanz der Zusammensetzung des Gesamtkollagens durch die Lebensalter hindurch besser verstehen.

4. Hypothesen

Wir möchten schliesslich noch eine mehr spekulative Idee diskutieren, nach welcher eventuell die thermische Kontraktion als physiologischer Mechanismus verstanden werden könnte:

Kollagen muss, wie überhaupt jeder Festkörper, unter langdauernder, starker und wiederholter Beanspruchung schliesslich eine Deformation erleiden; eine Sehne wird sich, wenn auch nur wenig, im Laufe des Lebens, der dauernden Zugsbeanspruchung nachgebend, verlängern.

Da nach Weir [36] die thermische Kontraktion auch bei Körpertemperatur, extrem verlangsamt, stattfinden kann, ist es nicht so abwegig, in ihr einen Weg zu erblicken, auf welchem die Sehne sich wieder auf die ursprüngliche, von der Funktion erforderte Länge verkürzt. Da die Kontraktion aber nur einsetzen kann, wenn der Längszug nicht zu gross ist, wäre der "Regulationsmechanismus" gerade richtig begrenzt: Nur eine tatsächlich zu lang gewordene Sehne könnte sich auf diese Weise wieder verkürzen.

Chemisch wäre diese "regulierende Kontraktion" dann begleitet von einer, selbstredend nur im mikroskopischen Bereich und an vereinzelten Stellen stattfindenden Schrumpfung, verbunden mit Austritt von K-Gelatine. Dies würde mit der beobachteten geringfügigen Abnahme des Mengenverhältnisses K-Gelatine/Ω-Elastoid im Alter in Einklang stehen. Die so entstandenen elastoidreicheren Partien hätten dann durch die Schrumpfung ein wenig von ihrer Parallelordnung eingebüsst.

Um die ganze - zugegebenermassen rein spekulative - Hypothese abzurunden, könnte man sich durchaus vorstellen (da ja der Stoffwechsel im lebenden Gewebe nicht stillsteht), dass sich eine Parallellagerung wieder allmählich herstellt. Die Aminoacyleinlagerung [64] wäre ein denkbarer Mechanismus, durch welchen sich eine gekrümmte Peptidkette unter Austritt eines Kettenteils wieder verkürzen und strekken könnte.

XI. Zusammenfassung

1. Das Interesse der heutigen chemischen Forschung am Kollagen ist vor allem auf lösliche Derivate, die aus dem Material junger Tiere durch kalte Extraktion durch Kochsalzlösung oder mit Puffern gewonnen werden, gerichtet. Diese Extrakte ("Tropo"- und "Prokollagen") werden als Vorstufe des gereiften Kollagens betrachtet.

2. Unsere Versuche, nämlich Studien über die "thermische Kontraktion", d.h. über die Verkürzung einer Sehne beim Erwärmen in reinem Wasser auf ca. 65°, sind geeignet, einen Einblick in den Bau festen Kollagens und dessen Abhängigkeit vom Alter zu vermitteln.

3. Wir stellten fest, dass die thermische Kontraktion zu einem Zerfall in einen unlöslichen, ingequollenem Zustand elastischen Faden (Elastoid nach Verzár), und eine gelatineartige, wasserlösliche Komponente ("Kontraktionsgelatine") führt.

4. Die Aminosäurezusammensetzung des Elastoids unterscheidet sich von derjenigen der "K-Gelatine" durch einen deutlich höheren Anteil an einer bestimmten Gruppe von vorwiegend lipophilen Aminosäuren (Cys, Val, Leu, Ileu, Phe, Thr und Asp).

5. Zwischen jungen und alten Tieren besteht kein wesentlicher Unterschied in der Aminosäurezusammensetzung des nativen Sehnenkollagens. Jedoch deckt die thermische Kontraktion bedeutende, altersbedingte Unterschiede auf. Der Austritt der Kontraktionsgelatine erfolgt jedoch bei jungen Tieren viel rascher als bei alten. Die Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils der zuerst auftretenden K-Gelatine ist bei jungen und bei alten Tieren praktisch gleich. Altes Elastoid unterscheidet sich hingegen von jungem in dem Sinne, dass die erwähnte Vermehrung der vorwiegend lipophilen Gruppe weniger ausgeprägt ist.

6. Wird nach einem Kontraktionsversuch, dessen mechanischer Ablauf (Kontraktion und Wiederverlängerung) nach einer Stunde abgeschlossen ist, die Extraktion im Wasser von 65° 48 Stunden lang fortgesetzt, so ist die Menge des zuletzt übrigbleibenden, unlöslichen Rückstandes "Ω-Elastoid" bei alten Tieren (7-10% des Sehnentrockengewichts) nur noch wenig grösser als bei jungen Tieren (5-7%). Umso deutlicher wird der Unterschied zwischen jung und alt in der Aminosäurezusammensetzung des "Ω-Elastoids" nach dieser verlängerten

Extraktion: in jungem "Ω-Elastoid" sind die Aminosäuren der lipophilen Gruppe besonders stark gegenüber der "K-Gelatine" vermehrt.

7. Die Diskussion der erwähnten Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung, unter genauer Berücksichtigung der Stoffbilanz, zeigt, dass sich junges Kollagen in zwei deutlich unterscheidbare Komponenten trennen lässt. Bei alten Tieren ist man jedoch zur Annahme gezwungen, dass diese beiden Komponenten weitgehend ineinander vernetzt vorliegen müssen. Durch ein solches Bild wird nicht nur der langsamere Austritt der "K-Gelatine" verständlich, sondern auch der analytische Befund. Dieser ist nämlich nur so zu interpretieren, dass die später austretende "K-Gelatine" mit Bruchstücken von Elastoid durchsetzt ist, und dass dem zuletzt übrigbleibenden Rückstand immer noch "K-Gelatine" anhaftet.

Tabelle 1 zu Abb. IV

Altersabhängigkeit der prozentualen Aufteilung von Sehnenkollagen in Fraktionen bei der thermischen Kontraktion. (100% = Trockengewicht der nativen Sehne, inkl. Rückstand des Waschwassers.)

Tieralter Monate	Bezeichnung des Versuchstieres	Totalgewicht der nichtgewässerten Sehne					
			K-Gelatine				
		Waschwasser Rückstand	5'Kontr. Phase	45'Phase	5'Phase + 45'Phase	Elastoid	Dialysat
2 Mon.	VT ♂	2,5	42,2	44,3	86,5	5,8	5,2
2 "	VT "	1,9	37,0	45,3	82,3	9,8	6,0
3 "	VT "	4,1	40,0	36,8	76,8	14,0	5,1
3 "	VT "	3,2	38,5	37,2	75,7	14,5	6,5
4 "	VT "	3,9	33,1	43,7	76,8	15,6	3,7
4 "	VT "	5,3	37,2	40,5	77,7	13,1	3,9
5 "	BS 180 "	3,7	30,0	46,2	76,2	11,5	8,6
5 "	VT "	5,2	37,0	38,8	75,8	13,2	5,8
6 "	VT "	4,0	21,0	56,8	77,8	13,4	5,8
6 "	VT "	3,5	25,5	48,2	73,7	17,3	5,5
7 "	VT "	5,0	25,6	50,5	76,1	14,1	4,8
7 "	VT "	4,5	27,6	44,8	72,4	17,3	5,8
9 "	BT 197 "	4,1	12,0	60,7	72,7	17,1	6,1
9 "	VT "	5,4	16,5	53,2	69,7	20,6	4,3
12 "	BQ 163 "	2,0	6,9	61,8	68,7	23,2	6,1
12 "	VT "	4,8	9,5	51,7	61,2	28,8	5,8
13 "	BP 138 "	5,6	12,0	53,7	65,7	23,4	5,3
13 "	VT "	3,8	11,6	52,1	63,7	26,5	6,0
16 "	BN 105 "	3,5	9,0	58,8	67,8	21,8	6,9
16 "	VT "	4,3	5,5	59,7	65,2	25,1	5,4
17 "	BM 90 "	3,1	5,2	59,8	65,0	26,2	5,7
17 "	VT "	4,5	4,3	62,3	66,6	23,5	5,4
18 "	BH 16 "	4,1	6,5	59,0	65,5	25,9	4,5
18 "	BJ 28 "	5,1	4,3	63,8	68,1	21,8	5,0
19 "	BL 76 "	3,9	9,0	59,3	68,3	21,0	6,8
19 "	BL 66 "	3,3	5,5	58,7	64,2	26,1	6,4
21 "	BH 25 "	3,6	3,6	62,8	66,4	25,0	5,0
21 "	BF 236 "	4,3	5,6	54,0	59,6	31,0	5,1
22 "	BE 231 "	4,1	5,0	55,8	60,8	31,0	4,1
22 "	BI 215 "	4,0	6,1	45,2	51,3	40,2	4,5
23 "	AF 71 "	5,0	9,1	37,0	46,1	41,8	7,1
23 "	BE 230 "	4,4	5,2	49,0	54,2	36,3	5,1
24 "	BF 248 "	4,1	6,1	46,8	52,9	37,9	5,1
24 "	AN 187 "	4,3	5,4	41,0	46,4	43,7	5,6
26 "	BC 195 "	2,7	3,6	41,8	45,4	45,3	6,6
26 "	BC 199 "	4,0	7,0	37,5	44,5	46,0	5,5
28 "	BM 177 "	3,5	5,5	25,5	31,0	60,0	5,5
28 "	AJ 112 "	5,3	5,4	26,8	32,2	57,6	4,9
31 "	AW 130 ♂	2,5	2,1	21,4	23,5	70,2	3,8
31 "	AW 102 ♀	3,3	2,6	27,2	29,8	62,2	4,7
32 "	AV 87 ♂	3,9	4,6	20,0	24,6	65,0	6,5
32 "	AD 34 "	4,1	4,9	18,0	22,9	67,5	5,5
34 "	VT "	3,9	5,1	22,2	27,3	64,0	4,8
34 "	VT "	4,3	3,5	20,2	23,7	66,8	5,2
43 "	AK 43 ♀	5,1	1,6	21,7	23,3	66,3	5,3

Tabelle 2 zu Abb. V

"Bruttozusammensetzung" (d.h. prozentuale Anteile an Proteinen und auswaschbarer bzw. dialysierbarer Substanz) von nativen Sehnen, Elastoiden und K-Gelatinen bei zwei typischen Altersklassen (7 und 32 Monate alte Tiere).

Material	Behandlung	Proteinanteil in Prozenten	Dialysat	Waschwasser
7 Monate alte native Sehne	10 Minuten gewässert (4°)	83,54		4,3
"	48 Stunden gewässert (4°)	82,07		4,2
32 Monate alte Sehne	48 Stunden gewässert	80,00		4,2
K-Gelatine	Kontraktionsversuch			
7 Monate alte Sehne	5' Periode	74,57	4,5	4,0
	45' Periode	84,68		
32 Monate alte Sehne	5' Periode	26,60	4,7	4,0
	45' Periode	75,54		
Elastoid				
7 Monate alte Sehne	50' Periode	87,83		
32 Monate alte Sehne	50' Periode	89,75		

Tabelle 3a zu Abb. V

Aminosäurezusammensetzung der K-Gelatine (5' und 45' Perioden) sowie des Elastoids

7 Monate alte Tiere

Aminosäuren	5'Periode		45'Periode		Elastoid	
	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV
1/2 Cystin					0,25	0,25
Tyrosin	0,41	0,47	0,45	0,46	0,77	0,77
Histidin	0,67	0,77	0,96	0,98	1,12	1,11
Isoleucin	0,87	1,00	1,04	1,06	1,73	1,70
Leucin	2,07	2,38	2,37	2,42	3,57	3,51
Valin	1,90	2,18	2,15	2,19	3,04	2,99
Threonin	1,59	1,82	1,83	1,86	2,22	2,18
Phenylalanin	1,10	1,26	1,37	1,39	1,60	1,57
Lysin	2,75	3,16	2,81	2,87	3,07	3,02
Asparaginsäure	3,86	4,43	4,39	4,48	5,10	5,02
Methionin	0,60	0,69	0,69	0,70	0,75	0,74
Serin	2,95	3,39	3,31	3,37	3,37	3,32
Glutaminsäure	5,98	6,86	6,80	6,93	7,02	6,92
Arginin	4,08	4,68	4,69	4,78	4,83	4,75
Alanin	8,67	9,95	9,78	9,97	9,37	9,23
Prolin	9,88	11,35	11,32	11,54	10,71	10,55
Hydroxyprolin	(6,88)	(7,84)	(6,51)	(6,63)	(6,35)	(6,23)
Glycin	26,11	29,98	29,11	29,68	27,43	27,03
Hydroxylysin	(0,39)	(0,44)	(0,49)	(0,50)	(0,55)	(0,54)
Ammoniak	6,12	7,02	6,57	6,69	6,56	6,46
SN	87,11	(100,00)	98,10	(100,00)	101,53	(100,00)

Definitionen von SN und AV siehe Seite 32

Die Reihenfolge der Aminosäuren wird in Tabelle 8c begründet.

Tabelle 3b zu Abb. V

Aminosäurezusammensetzung der K-Gelatine (5'- und 45'-Perioden) sowie des Elastoids

32 Monate alte Tiere

Aminosäuren	5'Periode		45'Periode		Elastoid	
	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV
1/2 Cystin					0,23	0,23
Tyrosin	0,15	0,38	0,39	0,42	0,57	0,57
Histidin	0,71	1,81	1,21	1,31	0,97	0,97
Isoleucin	0,28	0,71	0,94	1,02	1,26	1,26
Leucin	0,62	1,58	2,15	2,33	2,75	2,75
Valin	0,66	1,68	2,00	2,17	2,44	2,44
Threonin	0,63	1,60	1,59	1,73	1,93	1,93
Phenylalanin	0,45	1,15	1,17	1,27	1,40	1,40
Lysin	1,29	3,29	2,79	3,03	2,87	2,87
Asparaginsäure	1,42	3,62	4,09	4,44	4,69	4,69
Methionin	0,15	0,38	0,60	0,65	0,72	0,72
Serin	1,35	3,45	2,63	2,85	3,14	3,14
Glutaminsäure	2,33	5,95	6,15	6,68	6,71	6,71
Arginin	1,13	2,88	4,34	4,71	4,79	4,79
Alanin	3,02	7,71	9,22	10,00	9,65	9,66
Prolin	3,45	8,82	10,54	11,44	10,85	10,86
Hydroxyprolin	(2,03)	(5,18)	(6,86)	(7,45)	(6,83)	(6,84)
Glycin	8,98	22,94	28,95	31,43	31,06	31,08
Hydroxylysin			(0,50)	(0,54)	(0,51)	(0,51)
Ammoniak	9,42	24,07	5,01	5,44	5,30	5,30
SN	39,17	(100,00)	92,11	(100,00)	99,96	(100,00)

Legende zu den Tabellen 4a, b und c

Zusammenstellung der Aminosäurezusammensetzung nativen Kollagens verschiedener Altersstufen.

Darstellungsweise: linke Kolonnen = Mikromole pro 10 mg
rechte Kolonnen = AV-Werte gemäss Seite 34

Tabelle 4a:
Direkte Analysen nativer, gewässerter Sehnen.

Tabelle 4b:
Indirekte Analysen aufgrund einer Bilanz aus den Aminosäurebestimmungen aller Kontraktionsfraktionen. (Summe der Produkte, Aminosäuregehalt nach Mengenanteil jeder Fraktion, d.h. des Elastoids, der K-Gelatine und des K-Dialysats.)

Tabelle 4c:
Resultate anderer Autoren: K. Kühn, J. Kühn, K. Hannig, Hoppe Seyler's Z.f.physiolog. Chem. 326 50 (1961). Um Werte zu erhalten, die direkt mit unseren AV-Zahlen vergleichbar sind, wurden die Literaturwerte mit einem Faktor multipliziert, der zu einer gleichen Molsumme führt wie die mittlere Summe unserer AV-Werte. Zum Vergleich sind diesen Werten die Mittelwerte aus allen unseren eigenen direkten und indirekten (4a und 4b) Aminosäureanalysen (getrennt für junge und alte Tiere) sowie deren Standardabweichungen beigefügt.

Tabelle 4a zu Abb. V

Aminosäurezusammensetzung nativer Sehnen (7 und 32 Monate alte Tiere).

Aminosäuren	7 Monate alte Tiere 10' gewässert		7 Monate alte Tiere 48h gewässert		32 Mo alte Tiere 48h gewässert	
	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV
1/2 Cystin					0,11	0,12
Tyrosin	0,48	0,49	0,51	0,53	0,48	0,50
Histidin	1,39	1,43	1,13	1,18	1,59	1,66
Isoleucin	1,18	1,21	1,15	1,20	1,15	1,20
Leucin	2,61	2,68	2,55	2,66	2,50	2,62
Valin	2,44	2,51	2,35	2,45	2,29	2,40
Threonin	1,81	1,86	1,82	1,90	1,69	1,77
Phenylalanin	1,34	1,38	1,32	1,38	1,28	1,34
Lysin	2,89	2,97	2,96	3,09	2,98	3,12
Asparaginsäure	4,46	4,58	4,44	4,63	4,30	4,50
Methionin	0,67	0,69	0,67	0,70	0,66	0,69
Serin	2,77	2,84	2,93	3,06	2,40	2,51
Glutaminsäure	6,48	6,65	6,49	6,78	6,14	6,43
Arginin	4,55	4,67	4,75	4,96	4,45	4,66
Alanin	9,50	9,76	9,52	9,94	9,52	9,99
Prolin	10,98	11,27	10,75	11,22	10,44	10,93
Hydroxyprolin	(6,10)	(6,27)	(6,55)	(6,84)	(5,80)	(6,05)
Glycin	30,00	30,80	28,51	29,77	29,54	30,95
Hydroxylysin	(0,53)	(0,55)	(0,40)	(0,41)	(0,37)	(0,38)
Ammoniak	5,00	5,13	5,10	5,32	4,94	5,16
SN	97,38	(100,00)	95,79	(100,00)	95,48	(100,00)

Tabelle 4b

Aminosäurezusammensetzung von Sehnenkollagen (Bilanz der einzeln analysierten Kontraktionsfraktionen)

Alte Tiere (25 - 32 Monate)

Aminosäuren	I		II		III	
	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV
1/2 Cystin	0,13	0,14	0,12	0,13	0,16	0,16
Tyrosin	0,50	0,53	0,50	0,53	0,55	0,55
Histidin	0,99	1,05	0,71	0,75	0,86	0,87
Isoleucin	1,14	1,21	1,17	1,24	1,28	1,29
Leucin	2,51	2,66	2,62	2,78	2,76	2,77
Valin	2,25	2,39	2,38	2,52	2,50	2,51
Threonin	1,77	1,87	1,80	1,91	1,90	1,91
Phenylalanin	1,28	1,35	1,30	1,38	1,38	1,39
Lysin	2,73	2,89	2,81	2,97	2,92	2,93
Asparaginsäure	4,34	4,60	4,46	4,73	4,68	4,70
Methionin	0,66	0,70	0,66	0,70	0,66	0,66
Serin	2,92	3,09	2,94	3,11	3,10	3,11
Glutaminsäure	6,28	6,66	6,47	6,86	6,76	6,79
Arginin	4,54	4,81	4,50	4,77	4,72	4,74
Alanin	9,06	9,60	9,47	10,04	9,77	9,81
Prolin	10,26	10,88	9,97	10,56	10,87	10,92
Hydroxyprolin	(5,90)	(6,25)	(5,21)	(5,52)	(4,71)	(4,73)
Glycin	29,26	31,01	28,56	30,27	30,45	30,58
Hydroxylysin	(0,51)	(0,54)	(0,51)	(0,54)	(0,56)	(0,56)
Ammoniak	5,48	5,81	5,91	6,26	5,75	5,77
SN	94,36	(100,00)	94,37	(100,00)	99,57	(100,00)

Tabelle 4b

Aminosäurezusammensetzung von Sehnenkollagen (Bilanz der einzeln analysierten Kontraktionsfraktionen)

Junge Tiere (7 Monate)

Aminosäuren	I		II		III	
	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV
1/2 Cystin	0,15	0,16	0,15	0,16	0,16	0,18
Tyrosin	0,49	0,53	0,49	0,53	0,47	0,53
Histidin	0,89	0,95	0,59	0,64	0,75	0,85
Isoleucin	1,10	1,18	1,12	1,22	1,09	1,23
Leucin	2,48	2,65	2,46	2,68	2,40	2,71
Valin	2,22	2,37	2,27	2,47	2,19	2,47
Threonin	1,80	1,93	1,76	1,92	1,67	1,89
Phenylalanin	1,30	1,39	1,25	1,36	1,18	1,33
Lysin	2,78	2,97	2,55	2,78	2,51	2,84
Apsaraginsäure	4,27	4,57	4,30	4,68	4,10	4,63
Methionin	0,66	0,71	0,65	0,71	0,61	0,69
Serin	3,16	3,38	2,99	3,26	2,94	3,32
Glutaminsäure	6,45	6,90	6,34	6,90	6,22	7,03
Arginin	4,47	4,78	4,23	4,61	4,20	4,75
Alanin	9,17	9,80	9,12	9,93	8,69	9,82
Prolin	10,50	11,23	10,09	10,99	9,45	10,68
Hydroxyprolin	(7,33)	(7,83)	(5,75)	(6,26)	(7,46)	(8,43)
Glycin	27,43	29,32	28,82	31,38	27,06	30,58
Hydroxylysin	(0,54)	0,58)	(0,50)	(0,55)	(0,52)	(0,59)
Ammoniak	6,05	6,47	5,29	5,76	5,33	6,03
SN	93,51	(100,00)	91,84	(100,00)	88,48	(100,00)

Tabelle 4c

Aminosäurewerte anderer Autoren (s. Legende) — Mittelwert aus eigenen Analysen

	Rohkollagen Mol/ 100Mol Aminosäuren	"AV"	Kollagen umkrist. Mol/ 100Mol Aminosäuren	"AV"	AV jung	AV alt
½ Cys					0,16 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Tyr	0,39	0,36	0,29	0,27	0,52 ± 0,02	0,53 ± 0,02
His	0,54	0,50	0,58	0,54	1,01 ± 0,28	1,08 ± 0,40
Ileu	1,33	1,23	1,41	1,30	1,21 ± 0,02	1,23 ± 0,04
Leu	2,68	2,48	2,66	2,46	2,68 ± 0,02	2,71 ± 0,08
Val	2,05	1,90	2,08	1,92	2,45 ± 0,05	2,46 ± 0,06
Thr	1,79	1,65	1,76	1,63	1,90 ± 0,03	1,87 ± 0,07
Phe	1,28	1,18	1,26	1,17	1,37 ± 0,02	1,37 ± 0,02
Lys	2,84	2,63	2,84	2,63	2,93 ± 0,12	2,98 ± 0,06
Asp	4,65	4,30	4,69	4,34	4,61 ± 0,04	4,63 ± 0,10
Met	0,63	0,58	0,31	0,29	0,70 ± 0,01	0,69 ± 0,02
Ser	3,18	2,94	3,12	2,88	3,17 ± 0,22	2,96 ± 0,23
Glu	7,68	7,10	7,66	7,09	6,85 ± 0,14	6,69 ± 0,34
Arg	4,90	4,53	4,82	4,46	4,75 ± 0,02	4,75 ± 0,02
Ala	10,56	9,77	10,56	9,77	9,85 ± 0,08	9,86 ± 0,20
Pro	13,00	12,03	13,80	12,77	11,08 ± 0,24	10,82 ± 0,18
Hypro	8,80	8,14	8,96	8,29	7,13 ± 0,91	5,64 ± 0,77
Gly	33,10	30,62	33,22	30,73	30,37 ± 0,25	30,70 ± 0,35
Hylys	0,60	0,56	0,60	0,56	0,54 ± 0,07	0,51 ± 0,08
	(100,00)		(100,00)			

*) K. Kühn, J. Kühn, H. Hanig, Hoppe Seyler's Z.f.physiolog. Chem. 326 50 (1961)

Tabelle 5a zu Abb. VI

Aminosäurezusammensetzung der K-Gelatine 50'-Periode

7 Monate alte Tiere

Aminosäuren	I		II		III	
	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV
1/2 Cystin						
Tyrosin	0,43	0,46	0,40	0,46	0,44	0,47
Histidin	0,85	0,91	0,71	0,81	0,51	0,55
Isoleucin	0,97	1,03	0,91	1,04	0,97	1,05
Leucin	2,26	2,41	2,10	2,41	2,28	2,46
Valin	2,05	2,18	1,98	2,27	2,11	2,28
Threonin	1,74	1,85	1,57	1,80	1,69	1,82
Phenylalanin	1,27	1,35	1,12	1,28	1,21	1,31
Lysin	2,79	2,97	2,48	2,85	2,54	2,74
Asparaginsäure	4,19	4,46	3,94	4,52	4,22	4,55
Methionin	0,66	0,70	0,60	0,69	0,65	0,70
Serin	3,17	3,38	2,89	3,31	2,95	3,18
Glutaminsäure	6,48	6,90	6,18	7,09	6,38	6,88
Arginin	4,45	4,74	4,13	4,74	4,19	4,52
Alanin	9,35	9,96	8,75	10,02	9,40	10,14
Prolin	10,76	11,46	9,56	10,96	10,52	11,35
Hydroxyprolin	(7,67)	(8,20)	(6,72)	(7,80)	(5,87)	(6,33)
Glycin	27,97	29,79	27,26	31,30	30,00	32,37
Hydroxylysin	(0,43)	(0,46)	(0,52)	(0,60)	(0,49)	(0,53)
Ammoniak	6,40	6,82	5,27	6,05	5,39	5,82
SN	93,88	(100,00)	87,17	(100,00)	92,69	(100,00)

I und III = Analyse des Materials an je einem Einzeltier

II = Analyse des aus 5 Tieren gleichen Alters gewonnenen Materials

Tabelle 5b zu Abb. VI

Aminosäurezusammensetzung des Elastoids 50'-Periode

7 Monate alte Tiere

Aminosäuren	I		II		III	
	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV
1/2 Cystin	0,25	0,25	0,33	0,33	0,28	0,29
Tyrosin	0,77	0,77	0,79	0,78	0,73	0,75
Histidin	1,12	1,11	0,98	0,97	0,88	0,91
Isoleucin	1,73	1,70	1,90	1,88	1,79	1,84
Leucin	3,57	3,51	3,75	3,72	3,63	3,74
Valin	3,04	2,99	3,18	3,15	3,03	3,11
Threonin	2,22	2,18	2,23	2,21	2,24	2,30
Phenylalanin	1,60	1,57	1,58	1,57	1,56	1,60
Lysin	3,07	3,02	2,87	2,85	2,86	2,94
Asparaginsäure	5,10	5,02	5,22	5,18	5,13	5,28
Methionin	0,75	0,74	0,74	0,73	0,72	0,74
Serin	3,37	3,32	3,38	3,35	3,27	3,36
Glutaminsäure	7,02	6,91	7,02	6,96	6,87	7,07
Arginin	4,83	4,75	4,78	4,74	4,59	4,72
Alanin	9,37	9,23	9,23	9,15	8,90	9,15
Prolin	10,71	10,56	9,95	9,87	9,46	9,73
Hydroxyprolin	(6,35)	(6,30)	(7,39)	(7,36)	(5,43)	(5,60)
Glycin	27,43	27,03	28,33	28,12	26,55	27,32
Hydroxylysin	(0,55)	(0,53)	(0,54)	(0,53)	(0,54)	(0,55)
Ammoniak	6,56	6,46	5,93	5,88	6,41	6,59
NS	101,53	(100,00)	100,82	(100,00)	97,23	(100,00)

Tabelle 5c zu Abb. VI

Aminosäurezusammensetzung der K-Gelatine 50'-Periode

25 - 32 Monate alte Tiere

Aminosäuren	I		II		III	
	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV
1/2 Cystin						
Tyrosin	0,37	0,42	0,44	0,45	0,38	0,42
Histidin	1,15	1,31	0,96	0,99	0,53	0,58
Isoleucin	0,89	1,01	1,03	1,06	0,96	1,06
Leucin	2,03	2,31	2,30	2,37	2,18	2,40
Valin	1,90	2,16	2,22	2,29	2,08	2,29
Threonin	1,51	1,72	1,70	1,75	1,62	1,78
Phenylalanin	1,11	1,26	1,28	1,32	1,15	1,27
Lysin	2,67	3,03	2,71	2,80	2,66	2,93
Asparaginsäure	3,88	4,41	4,33	4,46	4,13	4,55
Methionin	0,56	0,64	0,64	0,66	0,62	0,69
Serin	2,53	2,87	3,09	3,18	2,97	3,27
Glutaminsäure	5,85	6,65	6,64	6,84	6,29	6,93
Arginin	4,34	4,93	4,55	4,69	4,21	4,64
Alanin	8,37	9,51	9,76	10,07	9,38	10,33
Prolin	9,94	11,29	10,78	11,11	9,87	10,87
Hydroxyprolin	(4,03)	(4,60)	(5,91)	(6,00)	(5,69)	(6,27)
Glycin	27,39	31,12	30,56	31,50	28,35	31,23
Hydroxylysin	(0,44)	(0,49)	(0,61)	(0,61)	(0,46)	(0,50)
Ammoniak	5,36	6,09	5,80	5,98	6,00	6,61
SN	88,01	(100,00)	97,01	(100,00)	90,78	(100,00)

Tabelle 5d zu Abb. VI

Aminosäurezusammensetzung des Elastoids 50'-Periode

25 - 32 Monate alte Tiere

Aminosäuren	I		II		III	
	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV
1/2 Cystin	0,23	0,23	0,18	0,17	0,14	0,14
Tyrosin	0,57	0,57	0,62	0,59	0,57	0,58
Histidin	0,97	0,97	0,84	0,81	0,78	0,79
Isoleucin	1,26	1,26	1,41	1,35	1,27	1,28
Leucin	2,75	2,75	3,01	2,89	2,85	2,88
Valin	2,44	2,44	2,69	2,58	2,57	2,60
Threonin	1,93	1,93	2,05	1,97	1,93	1,95
Phenylalanin	1,40	1,40	1,47	1,41	1,41	1,43
Lysin	2,87	2,87	3,14	3,01	2,99	3,02
Asparaginsäure	4,69	4,69	5,01	4,81	4,77	4,82
Methionin	0,72	0,72	0,75	0,72	0,69	0,70
Serin	3,14	3,14	3,21	3,08	3,02	3,01
Glutaminsäure	6,71	6,71	7,12	6,83	6,82	6,90
Arginin	4,79	4,79	4,97	4,77	4,77	4,82
Alanin	9,65	9,66	10,22	9,81	9,92	10,01
Prolin	10,85	10,87	11,40	10,95	10,41	10,53
Hydroxyprolin	(6,83)	(6,83)	(6,37)	(6,12)	(5,29)	(5,34)
Glycin	31,06	31,08	31,63	30,36	29,46	29,90
Hydroxylysin	(0,52)	(0,52)	(0,50)	(0,48)	(0,47)	(0,48)
Ammoniak	5,30	5,30	5,52	5,30	5,94	6,01
SN	99,96	(100,00)	104,19	(100,00)	98,85	(100,00)

Tabelle 6 zu Abb. VII

Cysteinsäure-Bestimmungen an nativen Sehnen, an K-Gelatine und 50'-Elastoid sowie an 24h und 48h Ω-Elastoid und an Prokollagen (nach Oxydation des Proteins mit Perameisensäure*).

7 Monate alte Tiere		µMol/ 10mg	25 - 32 Monate alte Tiere	µMol/ 10mg
Native Sehne		0,16		0,13
50'-K-Gelatine	1.	0,11		0,07
" "	2.	0,10		0,075
Elastoid	1.	0,36		0,17
"	2.	0,45		0,20
3 - 4 Monate alte Tiere			33 und 35 Monate alte Tiere	
24h Elastoid		0,85		0,46
48h "	= Ω-Elastoid	1,21		0,64
3 - 4 Monate alte Tiere				
Prokollagen				
NaCl-Extraktion		0,38		
Citrat-Extraktion		0,04		
Essigsäure-Extraktion		0,07		
Elastin 3 Wochen altes Kalb		0,73		
" 14jährige Kuh		0,39		

*) Die trockenen Präparate wurden 24h mit einer Lösung von 5 ml 30% H_2O_2 in 45 ml conc. Ameisensäure bei 20° behandelt und nach dem scharfen Abdampfen des Oxydationsmittels wie üblich hydrolysiert.

Tabelle 7 zu Abb. VIIIa und VIIIb

K-Gelatineabgabe bei verlängerter Versuchsdauer (total 8, 24 und 48h) in dest. H_2O bei 65°. (Junge Tiere)

Tieralter in Monaten:	3-4	3-4	5	7	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4
Gesamtversuchsdauer:	8h	8h	8h	8h	24h	24h	48h	48h	48h
a) Entnahme der Badflüssigkeit nach Stunden:	Trockenrückstand der Badflüssigkeiten								
1h	65,0	63,5	43,4	39,1					
2h	14,5	13,5	27,1	18,4	62,5	55,2			
3h	3,0	3,0	5,0	9,3					
4h	2,3	2,0	2,3	4,2	12,5	16,7			
5h	2,0	2,0	1,7	3,7					
6h	1,0	1,5	1,2	3,1	4,3	5,4	80,3	78,2	
7h	0,8	1,0	1,1	2,3					
8h	0,5	1,0	0,8	2,0	2,0	3,2			89,3
10h					1,5	1,68			
12h					1,5	0,94	5,7	6,5	
14h					1,0	0,72			
16h					0,8	0,47			1,4
18h					0,5	0,36	2,4	2,6	
20h					0,5	0,32			
22h					0,5	0,32			
24h					0,5	0,04	1,6	2,5	1,2
30h							1,4	1,4	
32h									1,1
36h							1,4	1,0	
40h									0,9
42h							0,8	0,5	
48h							0,5	0,4	0,6
Summe der 1° und 2° K-Gelatine:	89,1	87,5	82,6	82,1	87,6	85,15	94,1	93,1	93,5
b) Elastoid-Rückst. direkt gewogen:	10,0	11,2	16,7	16,9	11,9	14,5	5,6	6,8	5,4

a) Indirekte Bestimmung der Abnahme des Fadenrückstandes anhand der in das Bad abgegebenen Substanz bei verlängerter Extraktion

b) Kontrolle des übrigbleibenden Elastoid-Fadens anhand des Trockengewichts

Tabelle 7 zu Abb. VIIIa und VIIIb

K-Gelatineabgabe bei verlängerter Versuchsdauer (total 8, 24 und 48h) in dest. H_2O bei 65^{o} (alte Tiere)

Tieralter in Monaten:	25	30	35	37	35	34	32
Gesamtversuchsdauer:	8h	8h	8h	24h	48h	48h	48h
a) Entnahme der Badflüssigkeit nach Stunden:	Trockenrückstand der Badflüssigkeiten						
1h	17,8	17,0	15,3				
2h	12,0	10,2	14,0	20,6			
3h	9,5	7,2	7,9				
4h	6,6	5,2	5,2	19,2			
5h	5,0	3,1	3,6				
6h	5,2	2,0	2,4	7,3		31,8	38,0
7h	4,1	1,6	0,8				
8h	3,7	0,7	0,5	4,4	61,8		
10h				2,79			
12h				2,79		19,8	28,5
14h				2,72			
16h				2,60			
18h				2,32		12,5	11,2
20h				2,46			
22h				2,28			
24h				1,74	28,1	8,5	5,4
30h					6,1	6,5	4,4
32h							
36h					3,8	3,6	2,1
40h							
42h						2,0	1,3
48h					1,8	1,5	0,8
Summe der 1^{o} und 2^{o} K-Gelatine:	63,9	47,0	49,7	71,2	91,6	86,2	91,7
b) Elastoid-Rückstand direkt gewogen:	35,8	52,5	49,9	27,8	8,3	13,8	8,2

Tabelle 8a zu Abb. IX

Vergleich der Elastoide junger und alter Sehnen nach 50', 24h und 48h Extraktionszeit

Sehnenmaterial junger Tiere

	50'-Periode Tieralter: 7 Mon.		24h Extraktionszeit Tieralter: 3-4 Mon.		48h Extraktionszeit = Ω -Elastoid Tieralter: 3-4 Mon.	
Aminosäuren	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV
1/2 Cystin	0,28	0,29	0,49	0,51	0,82	1,02
Tyrosin	0,73	0,75	0,91	0,95	1,30	1,61
Histidin	0,88	0,90	1,05	1,10	1,29	1,55
Isoleucin	1,79	1,84	2,13	2,23	2,39	2,96
Leucin	3,63	3,73	4,13	4,32	4,57	5,67
Valin	3,03	3,11	3,48	3,64	3,52	4,37
Threonin	2,24	2,30	2,38	2,49	2,56	3,18
Phenylalanin	1,56	1,60	1,77	1,85	1,82	2,26
Lysin	2,86	2,94	2,97	3,10	3,46	4,29
Asparaginsäure	5,13	5,28	5,54	5,79	5,20	6,47
Methionin	0,72	0,74	0,50	0,52	0,75	0,93
Serin	3,27	3,36	3,50	3,66	3,21	3,98
Glutaminsäure	6,87	7,07	6,91	7,22	5,95	7,38
Arginin	4,59	4,72	4,47	4,67	3,91	4,85
Alanin	8,90	9,15	8,23	8,60	5,67	7,04
Prolin	9,46	9,74	8,41	8,79	5,43	6,74
Hydroxyprolin	(5,43)	(5,60)	(4,25)	(4,46)	(2,85)	(3,53)
Glycin	26,55	27,32	23,00	24,04	13,02	16,19
Hydroxylysin	(0,54)	(0,55)	(0,52)	(0,54)	(0,31)	(0,39)
Ammoniak	6,41	6,59	7,31	7,64	7,10	8,82
SN	97,23	(100,00)	95,67	(100,00)	80,63	(100,00)

Tabelle 8b zu Abb. IX

Vergleich der Elastoide junger und alter Sehnen nach 50', 24h und 48h Extraktionszeit

Sehnenmaterial alter Tiere

	50'-Periode Tieralter: 25-32 Mo		24h Extraktionszeit Tieralter: 32 Mo		48h Extraktionszeit = Ω-Elastoid Tieralter: 35 Mo	
Aminosäuren	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV
1/2 Cystin	0,18	0,17	0,41	0,41	1,08	1,16
Tyrosin	0,62	0,59	0,89	0,89	1,08	1,16
Histidin	0,84	0,81	0,99	0,99	1,09	1,17
Isoleucin	1,41	1,35	1,87	1,86	2,27	2,43
Leucin	3,01	2,89	3,87	3,85	4,10	4,39
Valin	2,69	2,58	3,24	3,23	3,33	3,57
Threonin	2,05	1,97	2,44	2,43	2,56	2,74
Phenylalanin	1,47	1,41	1,73	1,72	1,74	1,87
Lysin	3,14	3,01	3,16	3,15	3,13	3,36
Asparaginsäure	5,01	4,82	5,56	5,54	5,71	6,12
Methionin	0,75	0,72	0,85	0,85	0,66	0,70
Serin	3,21	3,08	3,56	3,55	3,37	3,61
Glutaminsäure	7,12	6,83	7,09	7,06	6,89	7,39
Arginin	4,97	4,77	4,72	4,70	4,47	4,79
Alanin	10,22	9,81	8,96	8,92	7,39	7,92
Prolin	11,40	10,94	8,92	8,87	8,27	8,87
Hydroxyprolin	(6,37)	(6,12)	(6,00)	(5,97)	(2,28)	(2,44)
Glycin	31,63	30,36	26,14	26,02	20,75	22,25
Hydroxylysin	(0,50)	(0,48)	(0,47)	(0,45)	(0,57)	(0,61)
Ammoniak	5,52	5,30	7,15	7,12	6,70	7,18
SN	104,19	(100,00)	100,42	(100,00)	93,28	(100,00)

Tabelle 8c zu Abb. IX

Verschiebung der Aminosäurezusammensetzung des Elastoids bei fortgesetzter Extraktion in dest. H_2O bei 65°

Sehnenmaterial junger Tiere

Aminosäuren	K-Gelatine 50'Periode AV	Elastoid 50'Periode AV	Elastoid 24h Extrakt AV	Elastoid 48h Elastoid AV	Quotient : * AV Ω-Elastoid / AV K-Gelatine
½ Cystin	0,11	0,29	0,49	1,02	9,20
Tyrosin	0,47	0,75	0,95	1,61	3,42
Histidin	0,55	0,90	1,10	1,55	2,81
Isoleucin	1,05	1,84	2,23	2,96	2,81
Leucin	2,46	3,73	4,33	5,67	2,30
Valin	2,28	3,11	3,65	4,37	1,91
Threonin	1,82	2,30	2,50	3,18	1,74
Phenylalanin	1,31	1,60	1,86	2,26	1,72
Lysin	2,74	2,94	3,11	4,29	1,56
Asparaginsäure	4,55	5,27	5,81	6,47	1,41
Methionin	0,70	0,74	0,52	0,93	1,32
Serin	3,18	3,36	3,67	3,98	1,25
Glutaminsäure	6,88	7,07	7,25	7,38	1,07
Arginin	4,52	4,72	4,69	4,85	1,07
Alanin	10,14	9,15	8,63	7,04	0,69
Prolin	11,35	9,73	8,82	6,74	0,59
Hydroxyprolin	6,33	5,60	4,46	3,53	0,58
Glycin	32,37	27,30	24,12	16,19	0,49

*) Die Reihenfolge der Aminosäuren nach absteigenden Werten dieser Quotienten wurde auch allen vorangehenden Aminosäuretabellen zugrunde gelegt.

Tabelle 8d zu Abb. IX

Verschiebung der Aminosäurezusammensetzung des Elastoids bei fortgesetzter Extraktion in dest. H_2O bei 65°

Sehnenmaterial alter Tiere

Aminosäuren	K-Gelatine 50'Periode AV	Elastoid 50'Periode AV	Elastoid 24h Extrakt AV	Elastoid 48h Elastoid AV	Quotient : AV Ω-Elastoid / AV K-Gelatine
1/2 Cystin	0,08	0,17	0,41	1,16	14,50
Tyrosin	0,42	0,59	0,89	1,16	2,76
Histidin	0,58	0,81	0,99	1,17	2,02
Isoleucin	1,06	1,35	1,86	2,43	2,29
Leucin	2,40	2,89	3,85	4,39	1,83
Valin	2,29	2,58	3,23	3,57	1,56
Threonin	1,78	1,97	2,43	2,74	1,54
Phenylalanin	1,27	1,41	1,72	1,87	1,47
Lysin	2,93	3,01	3,15	3,36	1,15
Asparaginsäure	4,55	4,81	5,54	6,12	1,34
Methionin	0,69	0,72	0,85	0,70	
Serin	3,27	3,08	3,55	3,61	1,10
Glutaminsäure	6,93	6,83	7,06	7,39	1,06
Arginin	4,64	4,77	4,70	4,79	1,03
Alanin	10,33	9,81	8,92	7,92	0,76
Prolin	10,87	10,94	8,88	8,86	0,81
Hydroxyprolin	6,27	6,12	5,97	2,44	0,37
Glycin	31,23	30,36	26,03	22,24	0,72

Legende zu Tabelle 9 und Abb. X

Aminosäurezusammensetzung des Dialysates der Kontraktionslösung

a) Dialysat vor der Analyse hydrolysiert

Zur Darstellung dieser Resultate, die jeweils den Gesamtgehalt der Substanz an einer einzelnen Aminosäure wiedergeben, wurde in gewohnter Weise der SN-Wert und daraus die einzelnen AV-Werte (vergl. Seite 34) berechnet und in die Abbildung als Gesamtlänge der Säulen eingetragen.

b) Dialysat ohne vorhergehende Hydrolyse analysiert

Zur Darstellung desjenigen Anteils einer Aminosäure, der in freier Form vorliegt, dürfen die einzelnen Analysenergebnisse (in µMol/10mg) nicht durch den (in der Tabelle eingeklammerten) SN-Wert an der unhydrolysierten Analyse dividiert werden, sondern sie sind durch denjenigen Wert, der für das Hydrolysat gefunden wurde (in der Tabelle unterstrichen) zu dividieren. Diese "AV"-Werte sind als schraffierte Partie in die Säulen eingezeichnet.

Somit bedeutet der schraffierte Teil der Säule die Menge einer Aminosäure in freier Form, der unschraffierte Teil den in Peptidform vorliegenden Mengenanteil.

In Abb. X entspricht jeweils die linke Säule dem Analysenresultat von einem jungen, die rechte Säule demjenigen von einem alten Tier.

Tabelle 9 zu Abb. X

Kontraktionsdialysat der 5'- und 45'-Perioden junger und alter Tiere

Amino-säuren	7 Mo alte Tiere				25 - 32 Mo alte Tiere			
	a) hydrolysiert		b) unhydrolysiert		a) hydrolysiert		b) unhydrolysiert	
	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	"AV"	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	"AV"
1/2 Cys	0,18	0,27	0,18	0,27	-	-	Spur	Spur
Tyr	0,39	0,58	0,31	0,46	0,20	0,36	0,04	0,07
His	0,70	1,04	0,09	0,10	0,61	1,10	0,05	0,09
Ileu	0,96	1,43	0,07	0,10	0,83	1,50	0,08	0,14
Leu	2,03	3,03	0,06	0,09	1,71	3,09	0,05	0,09
Val	1,91	2,85	0,18	0,27	1,48	2,68	0,12	0,22
Thr	1,25	1,86	0,13	0,19	1,01	1,82	0,07	0,13
Phe	0,75	1,12	0,05	0,07	0,66	1,19	0,03	0,05
Lys	1,70	2,53	0,27	0,40	1,28	2,32	0,16	0,29
Asp	2,75	4,10	0,09	0,10	2,17	3,92	0,07	0,13
Met	0,33	0,49	0,03	0,05	-	-	0,02	0,04
Ser	2,36	3,52	0,58	0,86	1,90	3,43	0,31	0,56
Glu	4,18	6,23	0,06	0,09	2,99	5,40	0,06	0,11
Arg	3,05	4,55	0,08	0,10	2,48	4,48	0,17	0,31
Ala	6,19	9,24	0,25	0,37	4,47	8,07	0,18	0,32
Pro	6,41	9,57	-	-	5,12	9,25	0,05	0,09
Hypro	(4,90)	(7,30)	0,05	0,07	(4,45)	(8,04)	Spur	Spur
Gly	20,39	30,43	0,51	0,76	15,85	28,64	0,22	0,40
Hylys	(0,49)	(0,73)	-	-	(0,57)	(1,03)	-	-
NH_3	6,06	9,04	-	-	8,23	14,86	2,40	4,33
SN	67,04	(100,00)	(3,28)	-	55,38	(100,00)	(4,39)	-

Tabelle 10 zu Abb. XI

Kolloidanteil des Waschwassers junger und alter Tiere nach der Hydrolyse
(Besprechung im Text Seite 65)

Aminosäuren	7 Monate alte Tiere		25-32 Monate alte Tiere	
	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV
1/2 Cystin	1,31	1,99	1,48	2,01
Tyrosin	1,40	2,12	1,43	1,94
Histidin	1,26	1,91	1,57	2,14
Isoleucin	1,98	3,00	2,08	2,83
Leucin	4,47	6,78	5,16	7,02
Valin	3,43	5,19	3,84	5,22
Threonin	2,89	4,38	3,15	4,28
Phenylalanin	2,17	3,29	2,37	3,22
Lysin	4,09	6,20	4,72	6,42
Asparaginsäure	4,91	7,44	5,55	7,55
Methionin	0,78	1,18	0,92	1,25
Serin	2,82	4,27	2,95	4,01
Glutaminsäure	5,62	8,52	6,46	8,79
Arginin	2,03	3,08	2,30	3,13
Alanin	4,65	7,05	5,16	7,02
Prolin	2,84	4,30	3,14	4,27
Hydroxyprolin	(0,65)	(0,98)	(1,57)	(2,14)
Glycin	4,21	6,38	3,92	5,33
Hydroxylysin	-	-	-	-
Ammoniak	7,75	11,74	8,74	11,88
SN	65,99	(100,00)	73,53	(100,00)

Tabelle 11 zu Abb. XII

Waschwasser (Interstitialflüssigkeit) junger und alter Tiere vor und nach der Hydrolyse*

	7 Mo alte Tiere				25 - 32 Mo alte Tiere			
	a) hydrolysiert		b) unhydrolysiert		a) hydrolysiert		b) unhydrolysiert	
Amino-säuren	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	"AV"	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	"AV"
½ Cys	0,11	0,36	0,19	0,63	0,07	0,20	0,09	0,25
Tyr	0,44	1,46	0,53	1,76	0,38	1,07	0,40	1,13
His	0,61	2,02	0,55	1,82	0,52	1,47	0,34	0,93
Ileu	0,53	1,75	0,50	1,66	0,45	1,27	0,43	1,21
Leu	0,94	3,11	0,92	3,05	0,81	2,28	0,76	2,14
Val	0,87	2,89	0,84	2,79	0,78	2,20	0,71	2,00
Thr	0,85	2,82	0,82	2,72	0,77	2,17	0,67	1,89
Phe	0,43	1,43	0,42	1,39	0,39	1,10	0,36	1,01
Lys	1,41	4,68	1,18	3,91	1,32	3,72	1,15	3,24
Asp	0,86	2,85	0,57	1,89	0,81	2,28	0,55	1,55
Met	0,32	1,06	0,28	0,93	0,25	0,70	0,22	0,65
Ser	1,16	3,85	1,56	5,17	1,01	2,85	1,16	3,27
Glu	2,26	7,50	1,34	4,44	1,69	4,76	0,95	2,70
Arg	0,48	1,59	0,43	1,43	0,40	1,13	0,36	1,01
Ala	2,39	7,92	2,31	7,66	1,49	4,20	1,41	3,97
Pro	0,99	3,28	0,95	3,15	0,76	2,14	0,67	1,89
Hypro	(0,52)	(1,93)	(0,37)	(1,45)	(0,38)	(1,04)	(0,18)	(0,51)
Gly	2,66	8,83	1,97	6,53	1,84	5,19	1,30	3,66
Hylys	(0,17)	(0,56)	(0,44)	(1,46)	(0,15)	(0,42)	(0,44)	(1,24)
NH_3	10,34	34,31	-	-	19,50	54,96	-	-
SN	30,15	(100,00)	(17,52)	-	35,48	(100,00)	(13,38)	-

*) Je eine Bestimmung vor und nach Hydrolyse an je einer aus dem Material von 5 jungen bzw. von 5 alten Tieren bestehenden Probe.
Berechnungsweise der AV bzw. "AV"-Werte wie in der Legende zu Tabelle 9.

Tabelle 12 zu Abb. XIII

Prokollagen-Extrakte

Amino-säuren	K-Gelatine 7 Mo alte Tiere		NaCl Extrakt 3-4 Mo alte Tiere		Citratpuffer-Extrakt 3-4 Mo alte Tiere		Essigsäure-Extrakt 3-4 Mo alte Tiere	
	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV
1/2 Cys	0,10	0,11	0,21	0,19	0,04	0,04	0,06	0,06
Tyr	0,43	0,46	0,94	0,84	0,35	0,33	0,31	0,30
His	0,85	0,91	0,92	0,82	0,74	0,70	0,60	0,58
Ileu	0,97	1,03	1,68	1,49	1,20	1,14	1,17	1,13
Leu	2,26	2,41	3,78	3,36	2,65	2,52	2,57	2,49
Val	2,05	2,18	3,25	2,89	2,56	2,43	2,46	2,39
Thr	1,74	1,85	2,61	2,32	1,95	1,85	1,94	1,88
Phe	1,27	1,35	1,71	1,52	1,28	1,22	1,20	1,16
Lys	2,79	2,97	3,81	3,39	3,05	2,89	2,98	2,89
Asp	4,19	4,46	5,69	5,06	4,79	4,55	4,72	4,58
Met	0,66	0,70	0,88	0,78	0,72	0,68	0,73	0,71
Ser	3,17	3,38	3,97	3,53	3,34	3,16	3,40	3,30
Glu	6,48	6,90	8,06	7,18	7,11	6,75	6,98	6,77
Arg	4,45	4,74	5,40	4,80	5,14	4,88	5,07	4,92
Ala	9,35	9,96	10,69	9,50	10,88	10,34	10,76	10,43
Pro	10,76	11,46	10,66	9,48	11,58	11,00	11,58	11,23
Hypro	(7,67)	(8,17)	(9,71)	(8,66)	(8,30)	(7,88)	(6,30)	(6,10)
Gly	27,96	29,69	30,90	27,47	33,87	32,18	32,57	31,58
Hylys	(0,43)	(0,46)	(0,51)	(0,45)	(0,55)	(0,52)	(0,69)	(0,67)
NH_3	6,40	6,82	7,17	6,37	5,13	4,87	5,37	5,21
SN	93,87	(100,00)	112,46	(100,00)	105,27	(100,00)	103,12	(100,00)

Tabelle 13 zu Abb. XIV

Aminosäurezusammensetzung von Elastin (Ligamentum nuchae)

Aminosäuren	3 Wochen altes Kalb		14 jährige Kuh	
	µMol/ 10mg	AV	µMol/ 10mg	AV
1/2 Cystin	Spur	Spur	0,40	0,45
Tyrosin	0,88	0,89	0,80	0,91
Histidin	0,36	0,36	0,28	0,32
Isoleucin	2,43	2,45	2,39	2,71
Leucin	5,68	5,74	5,70	6,47
Valin	10,94	11,04	11,56	13,12
Threonin	1,25	1,27	1,06	1,20
Phenylalanin	2,65	2,68	2,70	3,06
Lysin	1,50	1,51	0,77	0,87
Asparaginsäure	1,91	1,93	1,49	1,69
Methionin	0,25	0,25	0,17	0,19
Serin	1,33	1,34	1,16	1,32
Glutaminsäure	3,01	3,04	2,47	2,80
Arginin	1,44	1,45	1,25	1,42
Alanin	17,65	17,82	18,87	21,42
Prolin	10,72	10,83	10,96	12,44
Hydroxyprolin	(2,52)	(2,54)	(1,77)	(2,00)
Glycin	30,37	30,67	20,99	23,83
Hydroxylysin	(0,11)	(0,11)	(0,09)	(0,10)
Ammoniak	3,39	3,42	2,79	3,17
SN	99,06	(100,00)	88,11	(100,00)

Literaturverzeichnis

1.	W. Grassmann	Das Leder 6 241 (1955). Svensk Kem. Tidsk. 72 275 (1960). Das Leder 12 165 (1961).
	E. Buddecke	Angew. Chemie 72 663 (1960).
	P. H. Cowan	The Nature and Structure of Collagen.
	A. C. T. North	Butterworth London 1953.
	J. T. Randall	" "
	K. H. Gustavson	Chemistry and Reactivity of Collagen
	R. Borasky	1950 Guide to the Literature on Collagen, Bureau of Agricultural and Industrial, Agricultural Research Administration, U.S.D.A. Eastern Regional Research Lab. Philadelphia.
2.	A. Küntzel	Kolloid Z. 96 273 (1941).
	H. Petersen	Histologie und mikroskopische Anatomie, S. 161 Verlag von J. F. Bergmann, München 1935.
3.	J. Schaffer	Lehrbuch der Histologie und Histogenese, S. 83 Leipzig 1933, Verlag von W. Engelmann.
	P. Stöhr Jr.	Lehrbuch der Histologie, Springer Verlag Berlin 1951.
	E. Wöhlisch	Kolloid Z. 89 242 (1939).
	O. Gerngross K. Hermann W. Abitz	Biochem. Z. 228 408 (1930).
	K. H. Meyer C. Ferri	Pflügers Archiv 228 78 (1936).
	E. Wöhlisch H. G. Clamann	Z. Biol. 92 283 (1932).
4.	O. H. Lowry D. R. Galligan E. M. Katarsky	J. Biol. Chem. 139 795 (1941).
	D. A. Hall M. K. Keech R. Reed H. Saxl R. E. Tunbridge M. J. Wood	J. Gerontologia 10 388 (1955).
	D. A. Hall	Gerontologia 1 347 (1957).
	E. A. Laitinen	Z. Anat. Entwicklung. Gesch. 121 388 (1960).
	R. S. Bear	Advan. in Protein Chem. 7 89/94 (1952).
5.	S. M. Partridge J. E. Eastoe A. A. Leach	In Gelatin and Glue Research, Symposium Publ. Div. Pergamon Press London/New York 1958.
	S. M. Partridge H. F. Davis	Biochem. J. 61 21 (1955).

J. E. Eastoe — Biochem. J. 61 589 (1955).

R. E. Neumann — Arch. Biochem. 24 289 (1949).

K. Kühn
J. Kühn
K. Hannig — Hoppe Seyler's Z. f. physiol. Chem. 326 50 (1961).

6. A. Küntzel
F. Prakke — Biochem. Z. 267 243 (1933).

R. Herzog
H. W. Gonnel — Nat'wiss. 12 1153 (1924).

L. Pauling
R. B. Corey — Proc. Nat. Acad. Sci 37 272 (1951).

R. S. Bear — Adv. in Prot. Chem 7 69 (1952).

7. M. K. Keech — J. Biophys. and Biochem. Cyt. 9 193 (1961).

G. C. Wood
M. K. Keech — Biochem. J. 75 588 (1960).

G. C. Wood — Biochem. J. 75 598, 605 (1960).

G. Bahr — Exp. Cell. Res. 1 603 (1950).

J. Gross
J. H. Highberger
F. O. Schmitt — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 40 679 (1954).

F. O. Schmitt
J. Gross
J. H. Highberger — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 39 459 (1953).

J. H. Highberger
J. Gross
F. O. Schmitt — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 37 286 (1951).

F. O. Schmitt — Symp. Soc. Exp. Biol. 9 148 (1955).

H. E. Heimer
J. W. Mehl
R. J. Winzler — J. Biol. Chem. 185 561 (1950).

K. Schmid — J. Amer. Chem. Soc. 72 2816 (1950).

8. D. S. Jackson
A. A. Leach
S. Jacobs — Biochem. et Biophys. Acta 27 418 (1958).

K. Kühn
E. Zimmer — Z. f. Nat'forschg. 16b 648 (1961).

J. Gross — J. of Expl. Med. 107 247 (1958).

K. Kühn
J. Kühn
K. Hannig — Hoppe Seyler's Z. für physiol. Chem. 326 50 (1961).

K. Kühn
W. Grassmann
U. Hofmann — Z. Nat'forschg. 14b 436 (1959).

9. W. Grassmann — Das Leder 6 241 (1955).
Svensk Kemisk Tids. 72 278 (1960).

	D.S.Jackson A.A.Leach S.Jacobs	Biochem. et Biophys. Acta 27 418 (1958).
10.	R.S.Bear	Advan. in Protein Chem. 7 69 (1952).
11.	P.M.Cowan S.McGavin A.C.T.North	Nature Lond. 176 1062 (1955).
	R.S.Bear	Advan. in Protein Chem. 7 69 (1952).
	L.Pauling R.B.Corey	Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 37 272 (1951).
	G.N.Ramachandran G.Kartha	Nature Lond. 174 269 (1954).
	M.L.Huggins	J. Am. Chem. Soc. 76 4045 (1954). Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 43 209 (1957).
	R.E.Burge P.M.Cowan S.McGavin	in G.Stainby, Recent Adv. in Gelatin and Glue Research p. 25, Pergamon Press London/New York 1958.
	T.Nishihara P.Doty	Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 44 411 (1958).
	A.Rich F.H.Crick	Nature 176 915 (1955).
	J.T.Randall	J. Soc. Leather Trades Chem. 38 362 (1954).
12.	A.Rich F.H.Crick	in G. Stainby, Recent Adv. in Gelatin and Glue Research, p. 22 (1958).
13.	G.N.Rmachandran V.Sasisekaran	Nature 190 1004 (1961).
14.	C.E.Hall M.A.Jakus F.O.Schmitt	J. Amer. Chem. Soc. 64 1234 (1942).
	C.Wolpers	Klin. Wochenschrift 22 624 (1943).
	F.O.Schmitt J.Gross	J. Amer. Leather Chem. Assoc. 43 658 (1948).
	J.T.Randall	J. Soc. Leather Trades Chem. 38 362 (1954).
	P.Kaesberg M.M.Shurmann	Biochem. et Biophys. Acta 11 1 (1953).
	H.Hofmann Th.Nemetschek W.Grassmann	Z. f. Nat'forschg. 7b 509 (1952).
	W.Grassmann H.Hofmann Th.Nemetschek	Nat'wiss. 39 215 (1952).
	Th.Nemetschek W.Grassmann H.Hofmann	Z. f. Nat'forschg. 10b 61 (1955).

15. R. S. Bear — Adv. in Protein Chem. 7 69 (1952).

K. Kühn, W. Grassmann, U. Hofmann — Z. f. Nat'forschg. 13b 154 (1958).

" 14b 436 (1959).

K. Kühn, U. Hofmann, W. Grassmann, E. Gebhard — Nat'wiss. 45 521 (1958).

K. Kühn, U. Hofmann — Nat'wiss. 46 512 (1959).

W. Grassmann — Nat'wiss. 47 15 (1960).

K. Kühn, W. Grassmann, U. Hofmann — Nat'wiss. 44 538 (1957).

W. Schwarz, H. J. Merker — Histochem. 1 225 (1959).

F. O. Schmitt — J. Appl. Phys. 16 263 (1945).

K. Kühn, E. Gebhard — Z. f. Nat'forschg. 15b 23 (1960).

G. L. Humanson, C. C. Lushbangh — Stain Technol. 35 209 (1960).

16. R. S. Bear, O. A. E. Boldmann, T. P. Sola — J. Amer. Leather Chem. Assoc. 46 107 (1951).

R. S. Bear — Adv. in Protein Chem. 7 69 (1952).

O. Kratky, A. Sekora — J. Makromol. Chem. 1 113 (1943).

17. R. S. Bear — Adv. in Protein Chem. 7 69 (1952).

W. Grassmann — in Flaschenträger-Lehnartz Physiol. Chem., Bd. I, S. 658, Springer Verlag Heidelberg 1951.

H. Zahn — Angew. Chemie 64 295 (1955).

18. D. S. Jackson, J. H. Fessler — Nature 176 69 (1955).

R. D. Harkness, A. M. Marko, H. M. Muir, A. Neuberger — Biochem. J. 56 558 (1954).

J. Gross, J. H. Highberger, F. O. Schmitt — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 40 679 (1954).

J. H. Highberger — Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 37 286 (1951).

K. Hannig, J. Engel — Das Leder 12 215 (1961).

F. O. Schmitt, A. J. Hodge — Das Leder 11 74 (1960).

	J. Gross	Fed. Proc. 15 82 (1956).
19.	V. N. Orekhovitch A. A. Tustanovsky K. D. Orechovitch. N. J. Plotnikowa	Biokhimiya UdSSR 13 55 (1948).
	V. N. Orekhovitch	Science 127 1371 (1958).
	V. N. Orekhovitch	in Recent Adv. in Gelatine and Glue Research, p. 87 1958.
	M. K. Keech	J. Biophys. Biochem. Cyt. 9 193 (1961).
20.	J. Nageotte	Compte Rend. Soc. Biol. 96 828 (1927).
	P. A. Zachariades	C.R. Soc. Biol. Paris 52 182 (1900).
	M. B. Bensusan	J. Amer. Chem. Soc. 80 719 (1958).
	H. Noda	Biochem. Biophys. Acta 17 92 (1955).
21.	F. O. Schmitt	Rev. Modern Physics 31 349 (1959).
22.	J. Gross J. H. Highberger F. O. Schmitt	Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 41 1 (1954).
23.	J. A. Chapman	J. Biophys. Biochem. Cyt. 9 639 (1961).
	W. Robertson B. Schwartz	J. Biol. Chem. 201 689 (1953).
	F. Wassermann	Am. J. Anat. 94 399 (1954).
	R. Gieseking	Elektronenopt. Beobachtungen an Fibroblasten S. 131, in Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes, W. H. Hauss und H. Losse Ed. Stuttgart G. Thieme Verlag 1960.
	D. S. Jackson	Biochem. J. 65 277 (1957).
	M. R. Stetten R. Schönheimer	J. Biol. Chem. 153 113 (1944).
	M. R. Stetten	J. Biol. Chem. 181 31 (1949).
	V. Kobrle M. Chvapil	Nature 190 909 (1961).
	M. Chvapil & Co-worker	Exp. Cell. Research 26 18 (1962).
	G. B. Gerber K. J. Altmann	Nature 185 767 (1960). " 189 813 (1961).
	B. S. Gould J. F. Woessner	J. Biol. Chem. 226 289 (1957).
	B. S. Gould G. Maner	Am. N.Y. Acad. Sci. 85 385 (1960).
24.	H. Boedtker P. Doty	J. Amer. Chem. Soc. 78 4267 (1956).
25.	P. M. Gallop	Arch. Biochem. Biophys. 54 486 (1955).
26.	H. Noda	Biochem. Biophys. Acta 17 92 (1955).

M. B. Mewan
M. J. Pratt — in Nature and Structure of Collagen Butterworth Scient. Publ., London 1953.

J. H. Fessler — Biochem. J. 76 452 (1960).

K. Hannig
J. Engel — Das Leder 12 215 (1961).

V. N. Orekhovitch
V. O. Shpikiter — in Connective Tissue Symp. Blackwell Scient. Publ. Oxford 1957.

27. D. S. Jackson
J. H. Fessler — Nature 176 69 (1955).

J. H. Bowes
R. H. Kenten — Biochem. J. 235 358 (1948).

J. Engel — Hoppe Seyler's Z. f. physiol. Chem. 325 287 (1961).

P. Doty
T. Nishihara — in Recent Adv. in Gelatin and Glue Research p. 87.

K. A. Piez
E. Weiss
M. Lewis — J. Biol. Chem. 235 1987 (1960).

K. A. Piez
M. S. Lewis
J. Gross
G. R. Martin — Biochem. Biophys. Acta 53 596 (1961).

28. V. N. Orekhovitch — in Recent Adv. in Gelatin and Glue Research p. 87, Pergamon Press London 1958.

29. J. Northrop — J. Gen. Physiol. 10 161 (1926).

30. W. Grassmann
K. Hannig
J. Engel — Hoppe Seyler's Z. f. physiol. Chem. 324 284 (1961).

31. W. Grassmann — Kolloid Z. 77 205 (1936).

W. Grassmann
H. Endres
A. Steber — Z. f. Nat'forschg. 9b 513 (1954).

H. Hörmann — Beiträge z. Silikosenforschung Sonderband 2, 1957, p. 619.

I. Seizer — Enzymologia 13 293 (1949).

S. Michaels
P. M. Gallop
S. Seifter
E. Meilmann — Biochem. Biophys. Acta 29 450 (1958).

K. Heyns
G. Legler — Hoppe Seyler's Z. f. physiol. Chem. 315 288 (1959).

E. Habermann — " 324 232 (1961).

K. Kühn
J. Kühn
K. Hannig — " 326 50 (1961).

W. Grassmann
K. Hannig
H. Endres
A. Riedel — Hoppe Seyler's Z. f. physiol. 306 123 (1956).

W. Grassmann
K. Hannig
M. Schleyer — " 322 71 (1960).

W. Grassmann
A. Nordwig
H. Hörmann — " 323 48 (1961).

H. Grant
H. E. Alburn — Arch. Biochem. Biophys. 89 262 (1960).

T. D. Kroner
W. Tabroff
J. J. McGarr — J. Amer. Chem. Soc. 77 3356 (1955).

G. L. Mechanic
M. Levy — " 81 1889 (1959).

A. Kessler
H. Rosen
S. M. Levenson — J. Biol. Chem. 235 989 (1960).

R. E. Schrohenloher
J. D. Ogle
M. A. Logan — " 234 85 (1959).

32. W. Grassmann
U. Hofmann
K. Kühn
H. Hörmann
H. Endres
K. Wolf — in Tunbridge R.E. (ed) Connective Tissue, 157 Blackwell Oxford 1957.

J. Gross
B. Dunsha
N. Glazer — Biochem. Biophys. Acta 30 293 (1958).

J. Gross — J. of Expl. Med. 107 247 (1958).

W. Grassmann
H. Hörmann
R. Hafter — Hoppe Seyler's Z. f. physiol. Chem. 307 87 (1957).

33. J. Oneson
J. Zacharias — Arch. Biochem. Biophys. 87 271 (1960).

H. Hörmann — Das Leder 11 173 (1960).

H. Hörmann
G. Fries — Z. physiol. Chemie 311 19 (1958).

W. Grassmann
H. Hörmann
R. Hafter — " 307 87 (1957).

P. M. Gallop
S. Seifter
E. Meilmann — Nature 183 1659 (1959).

	K. H. Gustavson	J. Am. Leather Chem. Assoc. 50 239 (1955).
	K. Konno K. Altmann	Nature 181 995 (1958).
34a)	E. Gotschlich	Pflügers Arch. ges. Physiol. 54 109 (1893).
	H. Lerch	Gegenbaurs Jb. 90 192 (1950).
	I. Banga	Nature Lond. 172 1099 (1953).
	I. Banga J. Balo D. Szabo	" 174 788 (1954).
	E. Fauré-Fremiet	J. Chim. Phys. 34 125 (1937).
	C. E. Weir	J. Amer. Leather Chem. Ass. 42 17 (1949).
	C. E. Weir J. Carter	J. Res. Nat. Bur. Stand. 44 599 (1950).
	M. L. Anson	Adv. in Protein Chem. 2 361 (1945).
	C. E. Weir	J. Soc. Leather Trades Chem. 36 155 (1952).
	K. H. Meyer C. Ferri	Helv. Chim. Acta 18 570 (1935).
34.	A. Rollet	Von den Bindesubstanzen, Stricker's Handbuch der Lehre von den Geweben 1 35 (1871).
35.	A. Ewald	Hoppe Seyler's Z. f. physiol. Chem. 105 115 (1919).
36.	C. E. Weir	J. Research Nat. Bur. Stand. 42 17 (1949).
37.	M. Chvapil R. Zahradnik	Biochem. Biophys. Acta 40 329 (1960).
	F. Verzár H. Thönen	Gerontologia 4 112 (1960).
	D. J. Lloyd M. Garrod	Trans. Faraday Soc. 64 441 (1948).
	F. O. Schmitt	Adv. in Protein Chem. 1 53 (1944).
	E. Wöhlisch	Ergeb. Physiol. 34 405 (1932). Biochem. Z. 247 329 (1932).
	K. H. Gustavson	" 311 347 (1942).
	B. A. Wright N. W. Wiederhorn	J. Polymer Sci. 7 105 (1951).
38.	I. Banga	Gerontologia 1 325 (1957).
39.	K. H. Gustavson	Svensk Kem. Tidsk. 54 74 (1942). " 65 70 (1953).
	D. A. Hall R. Reed	Nature 180 243 (1957).
	B. I. Rigby J. D. Spikes	" 187 150 (1960).
40.	E. Wöhlisch	Biochem. Z. 247 329 (1932).
	A. Küntzel	Kolloid Z. 96 280 (1941).

41. F. Verzár
A. Meyer
Gerontologia 5 163 (1961).

42. A. Meyer
F. Verzár
Gerontologia 3 184 (1959).

43. R. E. Neumann
M. A. Logan
J. Biol. Chem. 184 299 (1950).

44. J. Ch. Martin
A. E. Axelrod
Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 83 461 (1953).

45. L. A. Elson
W. J. T. Morgan
Biochem. J. 27 1824 (1933).

46. N. F. Boas
J. Biol. Chem. 204 553 (1953).

47. F. Verzár
Experentia 11 230 (1955).
Gerontologia 1 363 (1957).
Helv. Physiol. Pharm. Acta 13 64 (1955).
" " 14 207 (1956).

F. Verzár
K. Huber
Gerontologia 2 81 (1958).

I. Banga
" 1 325 (1957).

48. V. N. Orekhovitch
Biokhimija 13 55 (1948).

49. W. G. Banfield
Anat. Rec. 114 157 (1952).

P. C. Brown
R. Consden
Nature 181 349 (1958).

T. H. McGavack
Expl. Med. Surg. 18 104 (1960).

K. Y. T. Kao
"

50. K. H. Gustavson
Acta Chem. Scand. 8 1298 (1954).
Nature 175 70 (1955).
J. Am. Leather Chem. Assoc. 50 239 (1955).

51. H. Boedtker
P. Doty
J. Amer. Chem. Soc. 78 4267 (1956).

R. J. Croome
Sci. Food Agr. 10 394 (1959).

W. Theimer
Z. Nat'forschg. 15b 346 (1960).

W. F. Harrington
P. H. v. Hippel
Arch. Biochem. Biophys. 92 109 (1961).

J. Gross
Nature 181 556 (1958).

P. J. Flory
W. K. Spurr
J. Amer. Chem. Soc. 83 1308 (1961).

P. J. Flory
R. Garret
" 80 4836 (1958).

P. J. Flory
S. Weaver
" 82 4518 (1960).

C. Cohen
J. Biophys. Biochem. Cyt. 1 203 (1955).

52. P. J. Flory
W. K. Spurr
J. Amer. Chem. Soc. 83 1308 (1961).

53.	E. Wöhlisch R. duMesnil-de Rochemont	Z. Biol. 85 406 (1927).
	K. H. Meyer	Bioch. Z. 214 253 (1929).
	E. Cherbuliez I. Jeanneret K. H. Meyer	Z. Physiol. Chem. 255 241 (1938).
	E. Wöhlisch	Biochem. Z. 247 329 (1932).
	E. Ewald	Z. Physiol. Chem. 105 115 (1919).
	E. Wöhlisch	Kolloid Z. 89 263 (1939).
54.	L. Hock	Z. f. Elektrochem. 31 405 (1925).
	H. Feuchter	Gummi-Ztg 29 1167 (1925).
	A. Küntzel	Kolloid Z. 96 279 (1941).
	W. Grassmann	" 77 205 (1936).
55.	T. H. M. McGavack K. Y. T. Kao	Exptl. Med. Surg. 18 104 (1960).
	N. H. Grant H. E. Alburn	Arch. Biochem. Biophys. 89 262 (1960).
56.	R. E. Glegg D. Eidinger C. P. Leblond	Science 120 839 (1954).
	G. Dittmann H. D. Cramer	Biochem. Z. 327 368 (1956).
57.	D. H. Spackmann W. H. Stein S. Moore	Anal. Chem. 30 1190 (1958).
58.	J. Beek	J. Research. Nat. Bur. Stand. 27 507 (1941).
	R. Bangle W. C. Alford	J. Histochem. Cytochem. 2 62 (1954).
	J. A. Moss	Biochem. J. 61 151 (1955).
59.	H. Hörmann	Vortrag gehalten auf dem VII. Kongress der Int. Union der Gerbereichemikerverbände in München 8. 9. 1959.
	J. H. Bowes R. G. Elliot J. A. Moss	Biochem. J. 61 143 (1955).
60.	K. H. Meyer E. A. Davidson A. Linker P. Hofmann	Biochem. Biophys. Acta 21 506 (1959).
	D. Kaplan K. H. Meyer	Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 105 78 (1960).
	R. W. Jeanloz G. Pahlke	Fed. Proc. 17 1082 (1958). J.A. Zellforschg. 39 421 (1954).

	J. Gersh H. R. Catchpole	Am. J. Anat. 85 457 (1949).
	S. D. Schultz-Handt N. Ey-Larson	Biochem. Biophys. Acta 46 311 (1961).
	H. Muir	Biochem. J. 69 195 (1958).
61.	W. Kuhn	Sonderdruck aus Nitsche/Wolf Kunststoffe, 1. Bd. Ed. K.A. Wolf, Springer Verlag Berlin/Göttingen/ Heidelberg 1962.
62.		Chem. & Eng. News, Part. I Feb. 12, 1962, p.138 Part II " 19, 1962, p.104.
63.	A. K. Piez M. S. Lewis G. R. Martin J. Gross	Biochem. Biophys. Acta 53 596 (1961).
64.	M. Brenner	J. of Cellular and Physiol. Suppl. 1 to Vol. 54 221 (1959).

Ich danke Herrn Dr. Rolf Weber und Fräulein Lisa Guiard für ihre Anregungen und Ratschläge.

Curriculum vitae

Alfred F. Meyer
Geboren 26. Mai 1924 in Basel
Heimatberechtigt in Basel und Niederhallwil

Nach dem Besuch der Primar- und Realschule in Basel trat ich in die Ciba A.G. ein, wo ich im Jahre 1946 die Laborantenprüfung bestand. In der Folge bereitete ich mich in Maturitäts-Abendkursen im Athenaeum Basel auf die Eidg. Matur vor, die ich 1950 absolvierte. Ich immatrikulierte mich hierauf an der Universität Basel und widmete mich zunächst dem Medizinstudium, das ich dann aber aus finanziellen Erwägungen aufgeben musste, um mich dem Chemiestudium zuzuwenden, das ich im Wintersemester 1954/55 aufnahm. Ich besuchte die Vorlesungen und Praktika der folgenden Dozenten: E. Batschelet, P. Bearth, M. Brenner, H. Dahn, H. Erlenmeyer, S. Fallab, M. Geiger-Huber, C.A. Grob, W. Kuhn, H. Labhardt, T. Reichstein, Ch. Tamm, M. Thürkauf, E. Wenk, R. Wizinger.

Am 29.8.1958 bestand ich das Hausexamen in organischer Chemie. Die Prüfungen in den Nebenfächern Botanik, Mineralogie, (Farbenchemie) und physikalischer Chemie bestand ich sukzessive in den Jahren 1957, 1959 und 1960.

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für experimentelle Gerontologie bei Herrn Prof. Dr. F. Verzár begonnen und im Institut für organische Chemie, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Brenner fertiggestellt.